



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

藥學博士學位論文

산두근의 항천식 활성과 화학성분

Anti-asthmatic Activity and Chemical Constituents
of *Sophora tonkinensis* Roots and Rhizomes

2015년 8월

서울대학교 大學院

藥學科 生藥學專攻

柳 憲 昇

국문초록

산두근 (*Sophora tonkinensis* Gagnepain roots and rhizomes)은 중국 남부 및 베트남에 걸쳐 분포하는 콩과 (Leguminosae)의 관목으로 높이는 1 ~ 2 m이다. 뿌리는 보통 2 ~ 5개이고 원기둥 모양이며 황갈색이다. 줄기는 원기둥 모양이고 표면에 흠이 있으며 짧고 부드러운 털이 조밀하게 덮여 있고 줄기 윗부분은 보통 "지(之)"자형으로 구부러져 있다. 약재로 쓰이는 말린 뿌리는 긴 원기둥 모양으로 약간 구부러져 있다. 표면은 갈색내지 흑갈색이고 세로주름이 있으며 가로로 길고 약간 돌기된 껍질눈이 있다. 한방에서는 예로부터 종양, 부종, 동통, 황달, 설사, 치질 등을 치료하는 목적으로 사용되어 왔다. 최근의 연구에 따르면 산두근 추출물 및 구성 성분이 anti-HBV 활성, 항염 작용, 해열, anti-tumor 활성, 항궤양 활성이 있다고 보고되고 있으나 산두근의 항천식 활성에 대한 체계적인 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서 천연물로부터 천식치료제 개발을 위해 다양한 문헌 및 database 검색을 통해 30여종 후보생약을 선정하였다. 이후 1, 2차 스크리닝을 통해 선정된 산두근의 최종 활성분획인 *n*-BuOH 층에서 활성 물질을 찾고 해당 활성분획을 대상으로 다양한 항천식 효과를 검증하고자 하였다. 이를 위해 *n*-BuOH 층을 가지고 다양한 silica gel column chromatography, RP-MPLC, RP-HPLC등을 통해 7종의 isoprenylated flavanone, 9종의 pterocarpin, 2종의 isoflavone, 1종의 flavones, 2종의 2-aryl benzofuran, 2종의 chalcone계 화합물을 분리하였다. 분리한 화합물의 이화학적 특성 및 분광학적 분석과 참고문헌과의 비교를 바탕으로 화합물 **1-23**을 2'-hydroxyglabrol (2,3-dihydro-7-hydroxy-2-[2,4-dihydroxy-3-(3-methyl-2-buten-1-yl)phenyl]-8-(3-methyl-2-buten-

1-yl)-4*H*-1-benzopyran-4-one) (**1**), 3-methylmaackiapterocarpan B (3-methoxy-8,9-methylenedioxy-2,2-dimethyl-pyrano[5',6':1,2]-[6*aR*,11*aR*] pterocarpan) (**2**), 2-hydroxy-1-prenyl-pterocarpin (3-methoxy-8,9-methylenedioxy-1-(3-methylbut-2-en-1-yl)-[6*aR*,12*aR*]pterocarpan-2-ol) (**3**), sophoranone (**4**), glabrol (**5**), 2-(2',4'-dihydroxy-phenyl)-8,8-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-8*H*-pyrano[2,3-*d*]chroman-4-one (**6**), 6,8-diprenyl-7,2',4'-trihydroxyflavanone (**7**), tonkinochromane A (**8**), maackiain (**9**), medicarpin (**10**), maackiain-3-*O*-glucoside 6"-acetate (**11**), medicarpin 3-*O*-glucoside 6"-acetate (**12**), pterocarpin (**13**), trifolirhizin (**14**), sophoranochromene (**15**), isoliquiritigenin (**16**), maackiapterocarpan B (**17**), formononetin (**18**), genistein (**19**), 7,4'-dihydroxyflavone (**20**), bolusanthin IV (**21**), 2-(2',4'-dihydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxybenzofuran (**22**)과 sophoradin (**23**)으로 결정하였다. 이중 화합물 **1**, **2**, 및 **3**은 천연에서 처음 분리, 보고되는 물질이다.

분리한 23종의 화합물에 대해 최근 천식관련 cytokine으로 주목받고 있는 IL-6의 생성과 관련된 억제활성을 측정하였다. 화합물 **1**, **5**, **9** 및 **21**이 IL-6 생성을 각각 IC₅₀ 1.62, 0.73, 3.01과 4.02 μ M 수준에서 억제함을 확인할 수 있었고 이 중 활성 분획물의 대표 지표성분인 화합물 **9** (maackiain)의 경우는 *in vivo* murine asthma 모델에서도 기관지내 백혈구 및 호산구 증가에 대해 유의적인 억제 효과를 보여 활성 분획의 quality control을 위한 active marker로서 선정이 가능함을 확인하였다. 하지만 분리된 활성성분들의 경우 활성분획 대비 수율이 낮고 여러 가지 위험인자의 복합적인 인과관계에 의하여 발생하는 다인성 질환인 천식에 대한 multifunction 효과를 충분히 얻기는 어렵다고 판단하였다. 이에 상업적으로 생산이 가능하고 multifunction 효과를 기대할 수 있는 산두근 *n*-BuOH 분획을 가지고 천식치료제를 개발하는 것이 타당하다고 판단하였다. 이에 산두근 *n*-BuOH 분획

을 SKI3301로 명명하고 다양한 *in vitro*, *in vivo* 약효연구 및 기전연구를 수행하였다. 감각된 기니픽의 적출기관지를 적출하여 organ-bath에 현수한 후 항원에 노출하여 유도되는 *in vitro* 기도 수축에 대한 억제 효과를 평가한 결과 용량의존적으로 현저한 수축억제 활성을 보였다. 이러한 강한 기도수축 억제 활성은 알러지성 수축 및 루코트리엔 의존성 수축의 두가지 *in vivo* 모델에서도 유의한 효과를 보였고 모두 대조약인 몬테루카스트 (montelukast) 대비 동등 이상의 효과를 보였다. 또한 기관지 수축 이외에 천식 질환의 또 한가지 특징인 기관지 염증에 대한 효과를 측정하기 위해 대표적인 *in vivo* 천식염증 측정 모델인 murine asthma 모델을 사용하여 그 효과를 측정한 결과 역시 유의한 천식염증 억제 효과를 관찰할 수 있었다. 이러한 항천식 효과는 단일 기전으로는 설명하기 어려운데 이에 대한 기전을 규명하고자 천식관련 매개체의 활성검색중 효과를 보인 5-lipoxygenase (5-LO), phosphodiesterase (PDE) 3/4, thromboxane synthase (TxS)에 대해 추가 시험을 진행하였다. 5-LO에 대해서는 1.61 $\mu\text{g/mL}$, PDE3에 대해서는 11.8 $\mu\text{g/mL}$, PDE4에 대해서는 5.56 $\mu\text{g/mL}$, TxS에 대해서는 0.634 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC_{50} 를 보여 해당 활성 분획이 multifunction을 가짐을 유추할 수 있었다.

결론적으로 SKI3301 성분연구를 통하여 화합물 **1, 5, 9, 21**이 IL-6 생성 억제효과가, 화합물 **9**는 천식염증 억제에 직접적 효과가 있음을 확인하였고 이러한 물질을 포함하고 있는 SKI3301에 대한 다양한 약효모델과 기전연구 결과 우수한 천식치료 효과를 보임을 알 수 있었다. 따라서 산두근으로부터 제조된 SKI3301은 항천식 치료 효과를 갖는 의약품으로 개발하기에 충분한 가치가 있음을 확인하였다.

주요어: *Sophora tonkinensis*, 천식, *in vitro* 기도수축억제, *in vivo* 기도수축억제,

murine asthma, 5-lipoxygenase, phosphodiesterase 3/4, thromboxane synthase, 2'-hydroxyglabrol (2,3-dihydro-7-hydroxy-2-[2,4-dihydroxy-3-(3-methyl-2-buten-1-yl)phenyl]-8-(3-methyl-2-buten-1-yl)-4*H*-1-benzopyran-4-one) (**1**), 3-methylmaackia-pterocarpan B (3-methoxy-8,9-methylenedioxy-2,2-dimethyl-pyrano[5',6':1,2]-[6*aR*,11*aR*]pterocarpan) (**2**), 2-hydroxy-1-prenyl-pterocarpin (3-methoxy-8,9-methylenedioxy-1-(3-methylbut-2-en-1-yl)-[6*aR*,12*aR*]pterocarpan-2-ol) (**3**), SKI3301, maackiain

학번: 2008-30997

목 차

국문초록	i
목차	v
List of Scheme	ix
List of Tables	x
List of Figures	xi
List of Abbreviations	xiii
I. 서론	1
1. 천식의 병인 및 질환적 특징	1
2. 연구배경	4
3. 산두근의 식물화학적 성분 및 활성	5
3.1. Triterpenoids	5
3.2. Alkaloids	7
3.3. Flavonoids	9
II. 실험재료 및 방법	11
1. 실험재료	11
1.1. 식물재료	11
1.2. 주요기기 및 시약	11
2. 추출 및 분획제조	15
3. 산두근 <i>n</i> -butanol 분획에 대한 성분분리	15
4. 활성측정	33
4.1. <i>In vitro</i> 기도수축 억제	33
4.2. <i>In vivo</i> 아라키돈산 유발 귀부종 억제	34

4.3. <i>In vivo</i> 기도염증 억제	34
4.4. <i>In vitro</i> IL-6 생성 억제	35
4.5. <i>In vivo</i> 기도수축 억제	35
4.5.1. OVA-유발 기도수축 억제	36
4.5.2. SRS-A 의존형 기도수축 억제	36
4.6. 통계 분석	37
5. 기전연구	37
5.1. 5-Lipoxygenase 억제 (5-LO)	37
5.2. Phosphodiesterase 3 억제 (PDE3)	38
5.3. Phosphodiesterase 4 억제 (PDE4)	38
5.4. Thromboxane synthase 억제 (TxS)	38
6. 배치간 유사도 평가	39
III. 결과 및 고찰	41
1. 산두근 활성 분획의 성분분리 및 구조규명	41
1.1. 산두근 및 활성 분획 선정배경	41
1.2. 성분 분리	42
1.3. 화합물 1의 구조	44
1.4. 화합물 2의 구조	48
1.5. 화합물 3의 구조	51
1.6. 화합물 4의 구조	54
1.7. 화합물 5의 구조	55
1.8. 화합물 6의 구조	56
1.9. 화합물 7의 구조	57
1.10. 화합물 8의 구조	58

1.11.	화합물 9 의 구조	59
1.12.	화합물 10 의 구조	60
1.13.	화합물 11 의 구조	61
1.14.	화합물 12 의 구조	63
1.15.	화합물 13 의 구조	64
1.16.	화합물 14 의 구조	65
1.17.	화합물 15 의 구조	67
1.18.	화합물 16 의 구조	68
1.19.	화합물 17 의 구조	69
1.20.	화합물 18 의 구조	70
1.21.	화합물 19 의 구조	71
1.22.	화합물 20 의 구조	72
1.23.	화합물 21 의 구조	73
1.24.	화합물 22 의 구조	74
1.25.	화합물 23 의 구조	75
2.	분리된 화합물 및 산두근 <i>n</i> -BuOH 분획의 항천식 효과	76
2.1.	분리된 화합물의 IL-6 생성 억제	76
2.2.	분리된 화합물의 기도염증 억제	79
2.3.	산두근 <i>n</i> -BuOH 분획의 항천식 효과	84
2.3.1.	<i>In vitro</i> 기도수축 억제	84
2.3.2.	<i>In vivo</i> 기도수축 억제	87
2.3.3.	<i>in vivo</i> 기도염증 억제	91
2.3.4.	기전연구	95
3.	배치간 유사도 평가	102

IV. 결론	-----	104
V. 참고문헌	-----	106
Abstract	-----	122

List of Scheme

Scheme 1. Isolation of compounds 1-23 from <i>n</i> -BuOH fraction of <i>S. tonkinensis</i> roots and rhizomes	19
--	----

List of Tables

Table 1. Mobile phase condition for HPLC-DAD analysis -----	39
Table 2. Inhibition of IL-6 production of compounds from <i>S. tonkinensis</i> -----	78
Table 3. Histopathological changes by major compounds in OVA-challenged BALB/c mice -----	83
Table 4. Histopathological changes by samples in OVA-challenged BALB/c mice -	94
Table 5. Pearson correlation coefficients on mean chromatogram about 9 major batches -----	103

List of Figures

Figure 1. The known triterpenoids isolated from <i>S. tonkinensis</i> -----	6
Figure 2. The known alkaloids isolated from <i>S. tonkinensis</i> -----	8
Figure 3. The known flavonoids isolated from <i>S. tonkinensis</i> -----	10
Figure 4. The structures of compounds 1 – 23 isolated from <i>n</i> -BuOH fraction of <i>S.</i> <i>tonkinensis</i> -----	43
Figure 5. The chemical structure of compound 1 -----	46
Figure 6. ¹ H-NMR spectrum of compound 1 (400 MHz, CD ₃ OD) -----	46
Figure 7. ¹³ C-NMR spectrum of compound 1 (100 MHz, CD ₃ OD) -----	47
Figure 8. HMBC spectrum of compound 1 -----	47
Figure 9. The chemical structure of compound 2 -----	49
Figure 10. ¹ H-NMR spectrum of compound 2 (400 MHz, CDCl ₃) -----	49
Figure 11. ¹³ C-NMR spectrum of compound 2 (100 MHz, CDCl ₃) -----	49
Figure 12. HMBC spectrum of compound 2 -----	50
Figure 13. CD spectrum of compound 2 -----	50
Figure 14. The chemical structure of compound 3 -----	52
Figure 15. ¹ H-NMR spectrum of compound 3 (400 MHz, CD ₃ OD) -----	52
Figure 16. ¹³ C-NMR spectrum of compound 3 (100 MHz, CD ₃ OD) -----	52
Figure 17. HMBC spectrum of compound 3 -----	53
Figure 18. CD spectrum of compound 3 -----	53
Figure 19. The key structure of isoprenylated flavanone and pterocarpan on the inhibition of IL-6 production -----	78
Figure 20. Effects of compound 14 (trifolirhizin) and compound 9 (maackiain) on the	

infiltration of inflammatory cells in BALF -----	80
Figure 21. Effects of compound 4 (sophoranone) on the infiltration of inflammatory cells in BALF -----	81
Figure 22. Effects on OVA-induced contraction of isolated trachea from sensitised guinea pigs -----	86
Figure 23. Effects on OVA-induced bronchoconstriction of passively sensitized conscious guinea pigs -----	88
Figure 24. Effects on SRS-A dependent bronchoconstriction in sensitized guinea pigs -----	90
Figure 25. Effects on WBC infiltration in BALF in challenged BALB/c mice ----	93
Figure 26. Inhibitory effect on 5-lipoxygenase activity in human PBML cells -----	97
Figure 27. Inhibitory effect on PDE3 enzyme activity in human platelets -----	97
Figure 28. Inhibitory effect on PDE4 enzyme activity in human U937 cells -----	99
Figure 29. Inhibitory effect on thromboxane synthase in human platelets -----	99
Figure 30. The proposed mechanism of SKI3301 -----	101
Figure 31. Mean chromatogram of 9 major batches -----	103

List of Abbreviations

BALF	: Bronchoalveolar lavage fluid
BuOH	: Butanol
CD	: Circular dichroism
CHCl ₃	: Chloroform
COSY	: Correlation spectroscopy
DMSO	: Dimethylsulfoxide
EtOH	: Ethanol
EtOAc	: Ethyl acetate
HRESIMS	: High resolution electrospray ionization mass spectroscopy
HMBC	: Heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	: High performance liquid chromatography
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
5-LO	: 5-Lipoxygenase
MeCN	: Acetonitrile
MeOH	: Methanol
NMR	: Nuclear magnetic resonance
PBML	: Peripheral blood leukocytes
PDE	: Phosphodiesterase
PMA	: Phorbol myristate acetate
TxS	: Thromboxane synthase
UV	: Ultraviolet absorption

I. 서론

1. 천식의 병인 및 질환적 특징

천식은 임상적으로는 반복적인 호흡곤란 및 천명음이 특징적이며 이러한 증상은 기침, 흉부 압박감 등과 동반될 수 있고 특히 밤에 악화된다. 생리적으로는 반복되는 기도 폐쇄로 인해 기류 장애가 발생하는 특징이 있다 (Bernstein, 2008). 병리적으로는 만성 염증이 가장 중요한 특징이며, 심해지면 기도의 구조변화를 동반하는 기도개형 (airway remodeling)이 유발된다 (Slade and Kraft, 2006). 과거에는 가역적인 기류 장애, 기도과민증 (airway hyper-responsiveness) 등 폐기능 소견을 중심으로 천식을 정의하였으나, 근래에는 기도염증의 중요성이 강조되면서 여러 세포와 다양한 매체들이 관여하는 기도의 만성 염증성질환으로 분류되고 있다. 천식은 전세계적으로 빈발되는 질환의 하나로서, 미국의 경우 약 이천이백만명의 천식환자가 존재하고 이로 인한 사회경제적 비용이 161억달러에 달하는 것으로 알려져 있다 (Balkissoon, 2008). 우리나라의 경우에도 대한소아알레르기 호흡기학회 역학조사연구위원회의 조사에 따르면, 6 ~ 15세 사이의 소아 천식 유병율이 1995년의 5.7%에서 2000년에는 7.6%로 증가하였다 (홍 et al., 2008). 특히 6 ~ 12세 사이의 유병율의 경우 2000년도에 유병율이 9.1%로 매우 높게 나타났다. 인구 십만명 당 천식으로 인한 사망자 수가 1992년의 12.9명에서 2002년에는 22.6명으로 2배 가까이 증가하였다 (Cho et al., 2006). 또한 국민 건강영양 조사 결과에 의하면 의사진단 유병률 조사에서 천식은 2001년 12.9명에서 2005년 23.3명으로 증가하였고, 이에 따른 사회경제적 부담도 2.5조에 이르는 것으로 추산되었다 (김영택, 2008). 기관지 천식은 여러 가

지 위험인자의 복합적인 인과관계에 의하여 발생하는 다인성 질환이어서 유발 물질에 의하여 그 병태 생리가 약간씩 다르나 근간이 되는 것은 주로 실내외 항원에 의한 알러지성 천식이다. 기관지천식은 가역적인 기도 폐색에 의한 호흡곤란과 천명의 증상을 보이면서 기관지 과민성을 특징으로 하는 기도 염증 질환으로 다음과 같은 특징을 가지고 있다. 첫째, 염증 질환이라는 측면이다. 이는 알러지, 감염 등으로 발병하지만 질환의 악화와 치료에 있어 염증이 매우 중요한 역할을 한다. 즉, 알러지, 감염 등으로 촉발된 백혈구 세포의 호흡기로의 유입과 활성화 그리고 이때 백혈구 세포로부터 유리되는 각종 싸이토카인, 염증 매개인자 등이 병을 악화시키고 치료를 어렵게 한다. 둘째, 기도가 외부 자극에 매우 민감하게 반응하여, 기도의 수축, 이완반응이 정상적으로 이루어지지 않고 호흡이 곤란해진다는 것이다. 즉, 기도가 손상되어 일반적 자극에 과도한 반응을 하거나 (천식) 기도가 좁아져 있어 (기관지염) 호흡이 곤란하므로 이의 적절한 치료가 필요하다. 천식치료제는 현재 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 조절제와 증상완화제로 나눌 수 있다. 증상완화제는 기도 평활근에 직접 작용하여 좁아진 기도를 확장시키기 위해 기도 확장제가 주로 사용되며, 조절제로는 기도내 염증과 기도과민성을 감소시키기 위해 항염증제가 주로 사용된다 (Krouse et al., 2008; Diamant et al., 2007). 항콜린제, 베타2 수용체 항진등의 기도 확장제는 질병을 악화시키는 염증에 효과가 미약하고 증상만 완화하기 때문에 장기간 사용시 약제 내성 발생 및 병증 악화의 우려가 있다 (Newnham et al., 1994). 조절제로 가장 널리 사용되는 스테로이드제는 항염증 효과가 매우 우수하나, 천식을 치료하지는 못하며, 장기간 투여하면, 얼굴부종, 감정변화, 대퇴골의 무혈성 괴사 등 심한 부작용 유발할 수 있어, 흡입제 형태로도 개발되어 있으나, 복용편의성 및 부작용 측면에서 문

제점이 제기되고 있다. 또한 흡입형 스테로이드 제제는 폐의 말단 부위까지 도달하기가 어렵기 때문에 소기도 (small airway)를 포함한 폐 전체의 염증을 조절하는데 한계가 있어, 전신 작용이 가능하고, 복용이 편리하며, 부작용 우려가 적은 염증 치료제가 요구되고 있다 (Bjermer, 2007). 이러한 약물로서 개발된 몬테루카스트 (montelukast)를 비롯한 경구용 루코트리엔 조절제는 경증 천식치료제로 널리 사용되나 효과가 흡입형 스테로이드제에 비해 그 효과가 약한 것으로 알려져 있다 (Bleecker et al., 2000; Laviolette et al., 1999). 따라서 현 약물치료제의 한계점을 극복하여, 원인을 근본적으로 치료하고 증상을 효과적으로 개선할 수 있는 새로운 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

2. 연구배경

천식은 앞서 기술한 바와 같이 각종 백혈구 세포와 여기서 유리되는 다양한 싸이토카인 및 염증 매개인자들이 관여하므로 단일 성분의 케미칼로는 효과적인 치료가 어렵다는 점 (Bloemen et al., 2007)에 착안하여 다양한 성분과 기전을 갖는 천연물 추출물이 효과적인 치료제가 될 수 있다고 판단하였다. 이를 위해 천식에 효과를 가질 수 있는 생약 후보를 각종 문헌 및 데이터베이스 검색을 통해 30종 선별하였고, 선정된 생약의 1차 스크리닝을 위해 *in vitro* 기도수축 억제 시험을 거쳐 4종의 생약을 선정하였다. 이후 2차 스크리닝으로서 *in vivo* 아라키돈산 유발 귀부종 모델을 사용하여 가장 우수한 활성을 보인 산두근 (*Sophora tonkinensis* Gagnepain roots and rhizomes)을 최종 후보생약으로 선정하였다. 산두근은 anti-HBV 활성, 항염 작용, 해열, anti-tumor 활성, 항궤양 활성 등이 있다고 보고되고 있으나 산두근의 항천식 활성에 대한 체계적인 연구는 미흡한 실정이었다. 이에 본 연구에서는 다양한 성분과 기전을 갖기 때문에 천연물 추출물이 효과적인 치료제가 될 수 있다고 판단되는 천식질환 영역에서, 산두근 활성 분획으로부터 화합물을 분리하여 구조를 규명하고 성분 및 해당 추출물에 대해 다양한 항천식 모델에서의 약효시험 및 기전연구를 통해 효과적인 천식 치료제 후보를 도출하고자 하였다.

3. 산두근의 식물화학적 성분 및 활성



산두근 (*Sophora tonkinensis* Gagnepain roots and rhizomes)은 콩과 (Leguminosae)에 속하는 월남괴 (*Sophora tonkinensis* Gagnepain)의 뿌리 및 뿌리줄기이다. 중국의 광서, 광둥, 귀주가 주산지이다. 이 약은 불규칙한 매듭

모양으로 된 근두부와 그로부터 원주형의 뿌리가 갈라져 있고 근두부의 끝에는 줄기의 잔기가 남아있다. 뿌리의 길이는 일정하지 않으나 30-50cm, 지름 7-5mm, 바깥면은 갈색-흑갈색이고 고르지 않은 세로주름과 가로로 돌출된 피목이 있다. 질은 몹시 단단하여 꺾기 어렵다. 꺾은 면은 평탄하나 섬유성이며 피부는 얇은 갈색이고 목부는 얇은 황색이다. 이 약은 콩비린 냄새가 있고 맛은 몹시 쓰다 (The Korean Herbal Pharmacopoeia, 2002). 한방에서는 예로부터 종양, 부종, 동통, 황달, 설사, 치질 등을 치료하는 목적으로 사용되어 왔다.

3.1. Triterpenoids

기존 문헌에서 soyasaponin I, II, soyasapgenol A, sophoradiol (Sakamoto et al., 1992), lupeol (Deng et al., 2007), cantoniensistriol, abrisapogenol C, abrisapogenol E, subprogenin B, soyasapogenol B (Takeshita et al., 1991), abrisapogenol C, wistariasapogenol A (Ding et al., 1992) 화합물이 보고되어 있다. 상기 화합물 중 soyasapogenol A, abrisapogenol E 는 vero cells에서 항 HSV-1 활성을 보인다 ($IC_{50} = 124 \mu M$) (Ikeda et al., 2005). Abrisapogenol C은 미처리군 대비, ICAM-

1 expression의 활성을 뚜렷하게 증가시킨다 (Ahn et al., 2002).

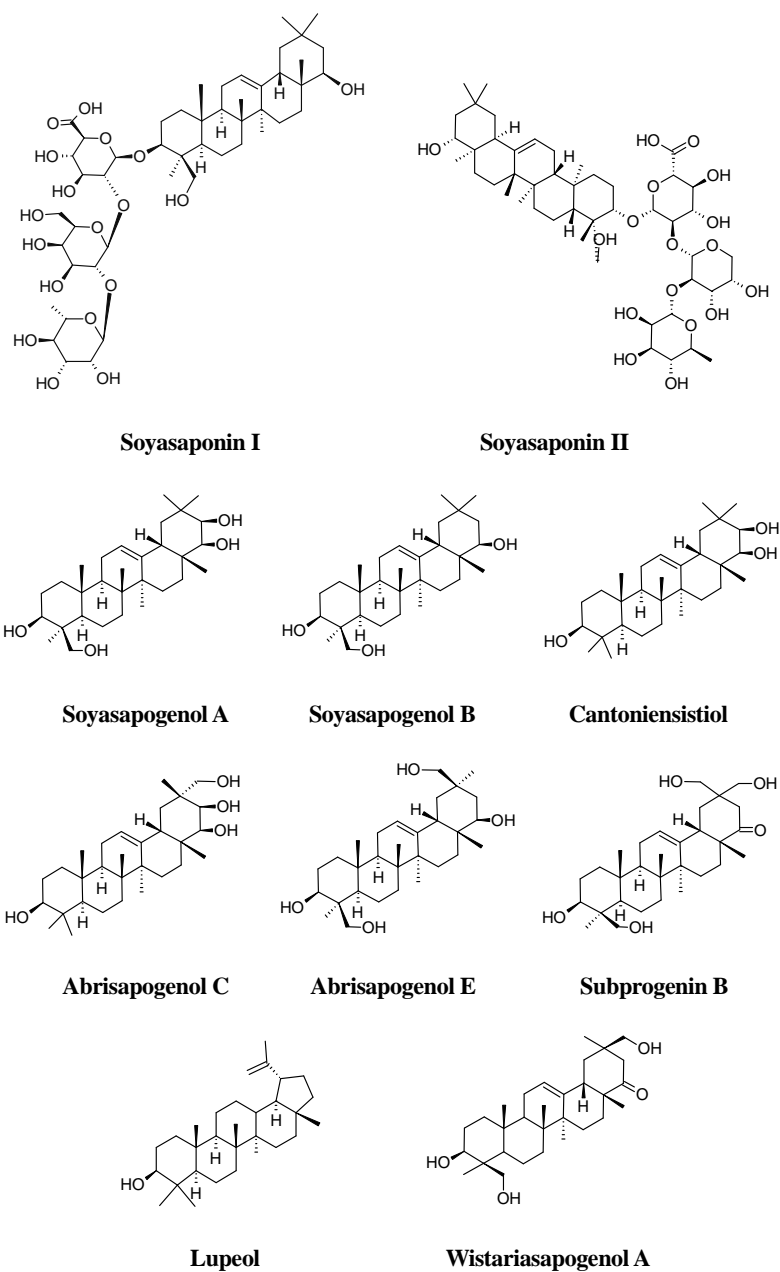
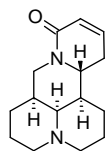


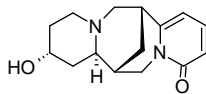
Figure 1. The known triterpenoids isolated from *S. tonkinensis*

3.2. Alkaloids

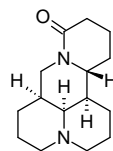
산두근에는 다양한 alkaloid가 존재하는데 sophocarpine, (-)-baptifoline, matrine (Xiao et al., 1999), oxymatrine (Kojima et al., 1970), tonkinensines A, B (Li et al., 2008b), cytisine (Dou et al., 1989), N-methyl cytisine (Ding et al., 2006) 등이 그것이다. Sophocarpin의 경우 acetic acid로 유발된 writhing test 에서 농도 의존적인 진통효과를 보였다 (Xiao et al., 1999). Matrine은 BALB/c mouse에서 항종양활성 (Ma et al., 2008), SD rat에서 간보호효과 (Zhai et al., 2007), oxymatrine과 더불어 항산화 효과 (Ao et al., 2009), 경구 투여시 dopamine의 유리 또는 dopamine 수용체에 작용하여 체온의 상승을 억제한다고 알려져 있다 (Cho et al., 1986b). 또한 5 ~ 20 mg/Kg 용량에서 용량의존적으로 hypotensive, bradycardiac effects를 갖는데 (*i.v.*, in rats) 이 효과는 약 1~3분간만 지속된다고 보고되어 있다 (Wei et al., 1985). 또한 matrine은 oxymatrine과 더불어 스트레스에 의한 항궤양작용 및 hydrocortisone 대비 우월한 항염증 작용을 가지고 있다고 알려져 있다 (Cho et al., 1986a). Oxymatrine은 항궤양 활성 (Yamazaki et al., 1984) 이 보고되어 있으며 cytisine의 경우 anti-HBV 활성이 알려져 있다 (Ding et al., 2006).



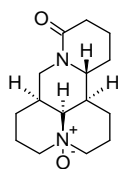
Sophocarpine



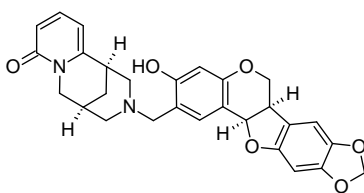
(-)-Baptifoline



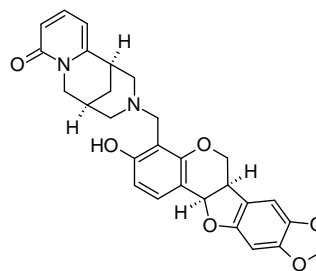
Matrine



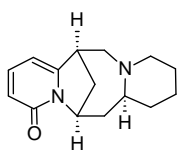
xymatrine



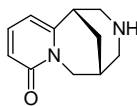
Tonkinensines A



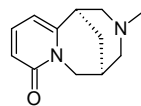
Tonkinensines B



Anagryrine



Cytisine



N-methyl cytisine

Figure 2. The known alkaloids isolated from *S. tonkinensis*

3.3. Flavonoids

산두근에서 flavonoid계열의 화합물이 다른 계열의 화합물보다 비교적 많이 알려져 있는데 기존 문헌에서 sophoradin, (-)-sophoranone (Komatsu et al., 1970), trifolirhizin, (-)-maackiain, 7,4'-dihydroxyflavone (Park et al., 2003), Bayin (Deng et al., 2007), trifolirhizin 6'-monoacetate (Komatsu et al., 1976), genistein (Lee et al., 2015) 등의 화합물이 보고되어 있다.

Trifolirhizin 은 IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)로 유발된 melanin 생성을 농도 의존적으로 억제한다고 알려져 있다 (Hyun et al., 2008). Maackiain은 항암 활성 (Wang et al., 2013), 항산화 및 항염증 (Lee et al., 2015), 항종양 (Kajimoto et al., 2002) 및 항원충 (Kapingu et al., 2006), 항박테리아 (Koysomboon et al., 2006) 활성이 알려져 있다. Sophoranone 은 항산화 및 항염증 (Lee et al., 2015), leukemia와 같은 혈액 암에 대한 활성 (Kajimoto et al., 2002)이 보고 되었다. 산두근에서 분리된 sophoranone 및 sophoradine은 유문결찰에 의한 위궤양, 스트레스에 의한 위궤양 모두에 대해서 강한 항궤양 작용을 가진다고 보고 되었다 (Sasajima et al., 1978)

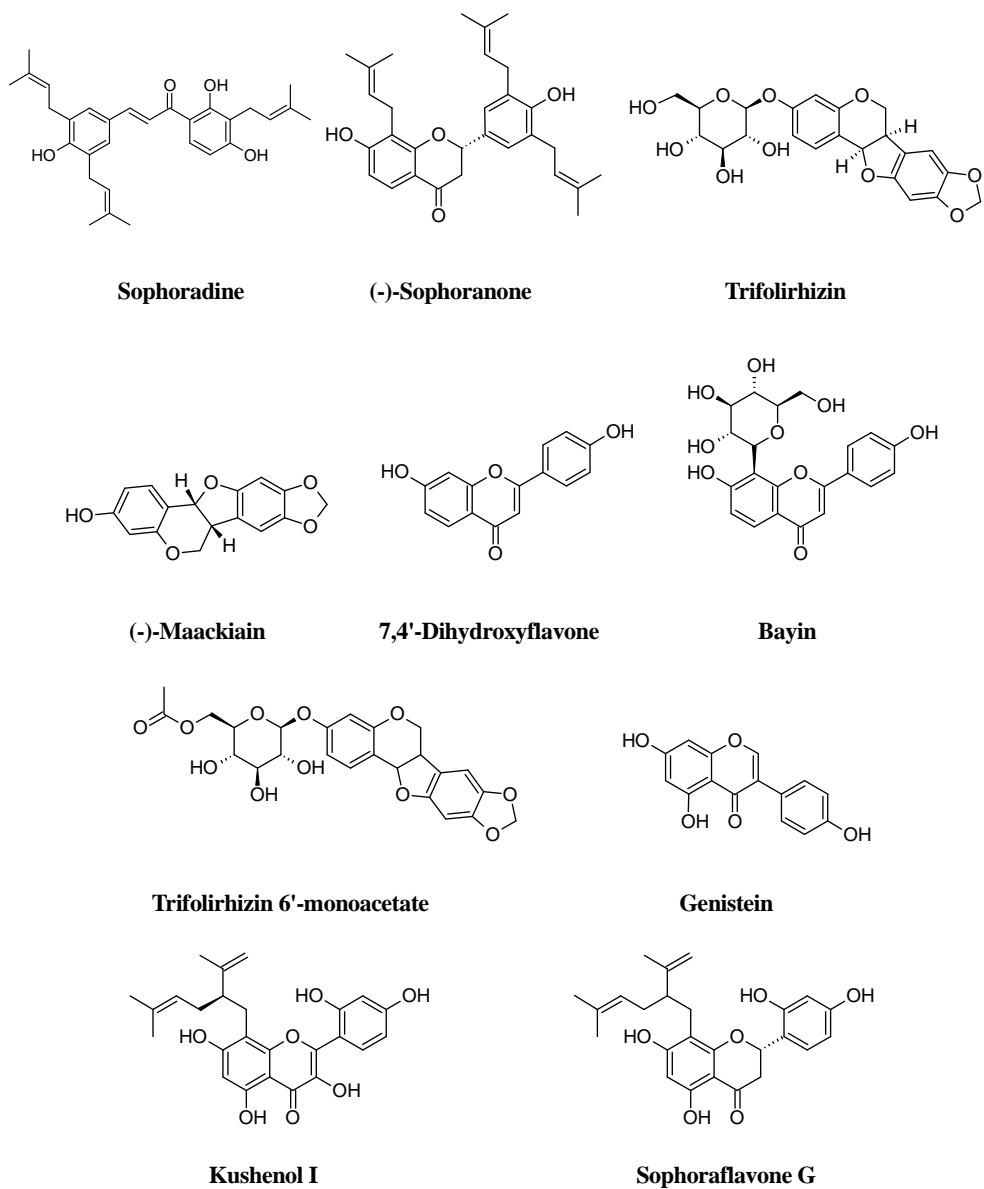


Figure 3. The known flavonoids isolated from *S. tonkinensis*

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 식물재료



실험에 사용한 산두근은 2006년, 2007년, 2009년 및 2011년 가을에 중국 광서성에서 채집한 시료를 사용하였고 증거표본은 서울대학교 약학대학 서영배

교수로부터 최종 감정을 받은 뒤 서울대학교 약학대학 천연물과학연구소 자원식물표본관에 보관하였다 (SKC04).

1.2. 주요기기 및 시약

■ 기기

MPLC

- Isolera One, Biotage, United Kingdom)

Prep. HPLC (Gilson, USA)

- Gilson 321 pump, Gilson 172 Diode Array Detector

Analytical HPLC

- Agilent 1290 Infinity LC System
- Agilent ChemStation

FT-NMR

- Varian 400 (400 MHz, USA)

Mass Spectrometer

- Waters Xevo G2 Q-TOF, USA
- API4000 LC-MSMS, ABSCIEX, USA

CD spectrometer

- Chirascan TM, Applied photophysics Ltd, UK

UV spectrometer

- Beckman Coulter, Germany

ELISA microplate reader

- SOFTmax, Molecular Devices Corp., USA

Jet nebulizer

- Hugo Sachs Electronick, Hugstetten Germany

Cell counter

- MS9-5H, Melet Schloesing Lab. Osny France

Cytospin

- Cyto-tek Cytocentrifuge. Sakura, Japan

Hemacolor

- Merck, Germany

Force transducer

- Biegestab K30 Type 351, Hugo Sachs Electronik, March/Friburg, Germany

Transducer coupler

- Type A, Coulborn Instruments, PA, USA

Double Chamber Plethysmograph Box

- HSE, Germany

Microbeta2

- PerkinElmer, Waltham, MA, USA

Autoclave

- Sakura Steam sterilizer VS, Japan

Microscope

- Olympus BX51, Japan

Luminometer

- VICTOR3™ 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer, USA

Incubator

- Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Centrifuge

- Megafuge 2.0R, Heraeus, Germany
- Eppendorf 5414S, Germany

■ 분석용 시약 및 재료

Column chromatography

- Kiesel 60 (40 - 60 μm , 230 mesh), Merck, Germany
- Diaion HP-20 (250 - 260 μm), Mitsubishi Chemical, Japan

MPLC column

- KP-C18-HS 120 g , Biotage, UK

TLC

- TLC Silica Gel 60 RP-18 F₂₅₄ , Merck, Germany
- TLC Silica Gel 60, Merck, Germany

- 10% H₂SO₄ - water solution

Prep. Column

- Luna 5 μ C18 (5 μ m, 100 Å, 250 × 10 mm I.D.), Phenomenex, USA
- J'Sphere ODS-H80 (4 μ m, 8 nm, 250 × 10 mm I.D.), YMC, Japan
- Inertsil ODS-3 (5 μ m, 100 Å, 250 × 10 mm I.D.), GI Science, Japan

HPLC 용매

- MeOH 및 MeCN, Burdick & Jackson, Germany

기타시약

- MeOH, CHCl₃, *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH, SK Chemicals, Korea
- CDCl₃, CD₃OD etc, Cambridge Isotope Laboratories, USA

■ *In vitro* 및 *in vivo* 약효시험용 시약 및 재료

대조약

- Montelukast sodium, Ranbaxy Laboratories, India
- Rolipram, Sigma, USA

시약

- Calcium ionophore A 23187, Sigma, USA
- OVA (Albumin from chicken egg white, Grade V), Sigma, USA
- Alum (Imject Alum), Pierce Biotechnology, USA
- Hematoxylin and eosin, Sigma, USA
- Periodic acid Schiff (PAS) stain, Sigma, USA

Kit

- LTB₄ enzyme immunoassay kit, Assay Design Inc., USA
- Thromboxane immunoassay assay kit, Assay Design Inc., USA

- IL-6 assay kit, BD Bioscience, USA

2. 추출 및 분획제조

약 0.5 ~ 2.0 cm 정도로 세절된 산두근 10 kg을 고루 섞은 후, 70 L의 50% 에탄올을 가해 80℃에서 4시간 동안 추출하였다. 여액을 취하여 모으고 잔사에 대해서는 70 L의 50% 에탄올을 다시 가해 재추출한 후 여액을 모두 합하여 농축하였다. 10 L까지 감압농축한 뒤 동량의 *n*-BuOH로 2회 분획하여 약 400 g의 *n*-BuOH 분획물을 얻었다.

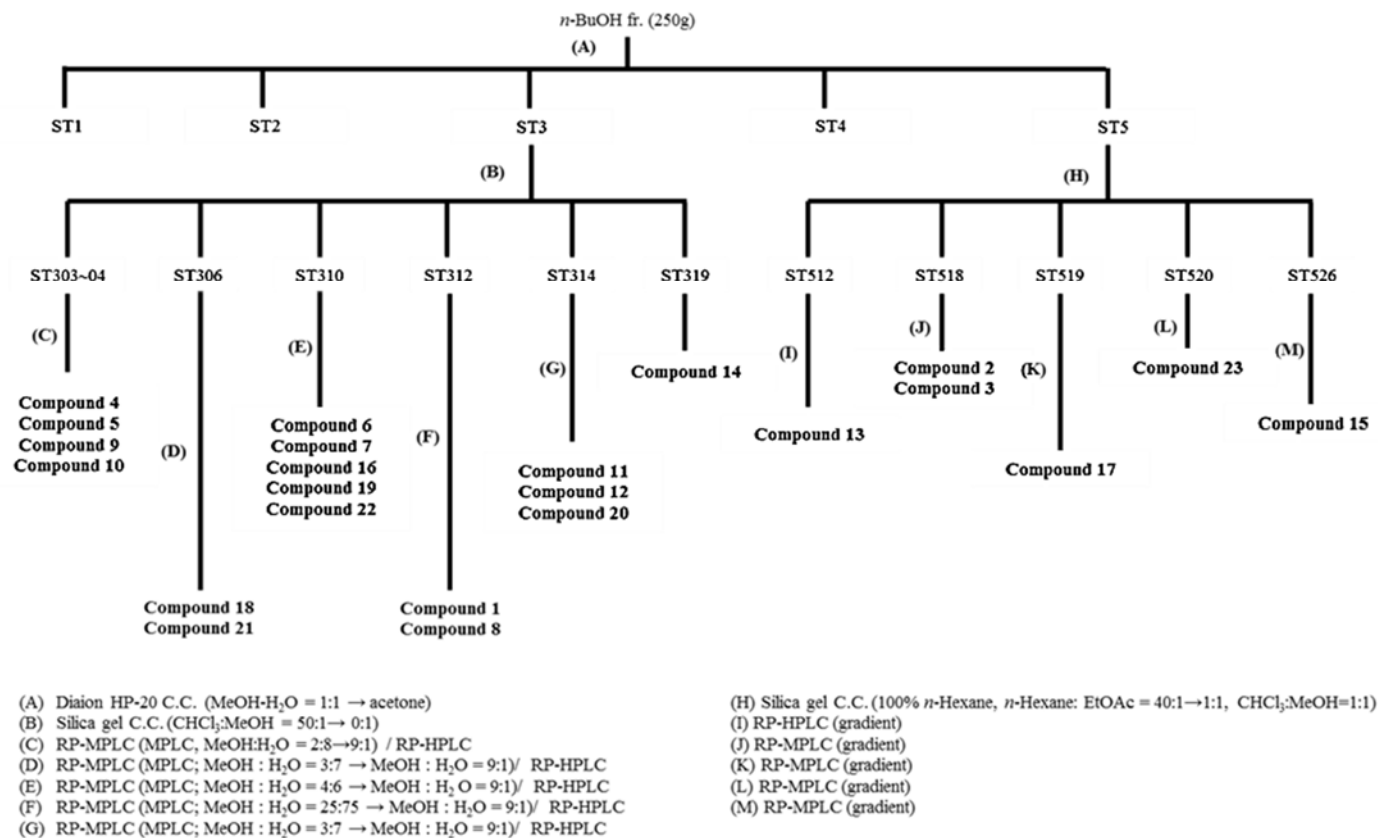
3. 산두근의 *n*-BuOH 분획에 대한 성분분리

n-BuOH 분획 약 250 g 가지고 다공성수지 (Diaion HP-20)를 충전한 컬럼 크로마토그래피 (MeOH : H₂O = 50 : 50 → MeOH : H₂O = 70 : 30 → MeOH : H₂O = 90 : 10 → MeOH : H₂O = 100 : 0 → 100% acetone)를 실시하여 5개의 분획을 얻었다 (ST1 ~ ST5). ST3에 대해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CHCl₃ : MeOH = 50 : 1 → CHCl₃ : MeOH = 30 : 1 → CHCl₃ : MeOH = 15 : 1 → CHCl₃ : MeOH = 10 : 1 → CHCl₃ : MeOH = 8 : 1 → CHCl₃ : MeOH = 5 : 1 → CHCl₃ : MeOH = 1 : 1 → CHCl₃ : MeOH = 0 : 1)를 진행해 총 21개의 분획을 얻었다 (ST301 ~ ST321). 소분획 ST319에서 화합물 **14** (1.5 g)를 침전으로 얻었다. 소분획 ST303과 ST304를 혼합하여 RP-MPLC (Biotage C18, MeOH : H₂O = 20 : 80 → MeOH : H₂O = 90 : 10)를 실시하여 총 26개의 소분획으로 나누었다 (ST3C301 ~ ST3C326). 이 중 소분획 ST3C315에서 화합물 **4** (7.0 mg)를 침전을 통하여 얻었다. 소분획 ST3C304 (14.6 mg)을 RP-

HPLC (YMC C18, MeCN : H₂O = 40 : 60; flow rate, 2 mL/min)를 실시하여 화합물 **9** (t_R 48.9 min, 7.0 mg)와 화합물 **10** (t_R 55.6 min, 1.1 mg)을 분리하였다. 소분획 ST3C319 (8.0 mg)을 RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, MeCN : H₂O = 60 : 40; flow rate, 2 mL/min)를 실시하여 화합물 **5** (t_R 34.4 min, 2.0 mg)를 분리하였다. 소분획 ST306 (205 mg)을 RP-MPLC (Biotage C18, MeOH : H₂O = 30 : 70 → MeOH : H₂O = 90 : 10)를 실시하여 총 23개의 소분획으로 나누었다 (ST30601 ~ ST30623). 이 중 소분획 ST30611 (8 mg)을 RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, MeCN : H₂O = 50 : 50; flow rate, 2 mL/min)를 실시하여 화합물 **21** (t_R 19.7 min, 3.4 mg)을 분리하였다. 소분획 ST30611 (12 mg)을 RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, MeCN : H₂O = 40 : 60; flow rate, 2 mL/min)를 실시하여 화합물 **18** (t_R 29.5 min, 1.5 mg)을 분리하였다. 소분획 ST310 (240 mg)을 RP MPLC (Biotage C18, MeOH : H₂O = 40 : 60 → MeOH : H₂O = 90:10)를 실시하여 총 23개의 소분획으로 나누었다 (ST310-01 ~ ST310-23). 소분획 ST310-06 (9.7 mg)을 RP-HPLC (YMC C18, MeOH : H₂O = 60 : 40; flow rate, 2 mL/min)를 실시하여 화합물 **19** (t_R 21.8 min, 3.8 mg)와 화합물 **16** (t_R 29.8 min, 1.9 mg)을 분리하였다. 소분획 ST310-09 (2.7 mg)을 RP-HPLC (Inertsil ODS-3, MeCN : H₂O = 50 : 50; flow rate, 2 mL/min)를 실시하여 화합물 **22** (t_R 28.7 min, 1.0 mg)를 분리하였다. 소분획 ST310-14 (12.0 mg)를 RP-HPLC (Inertsil ODS-3, MeOH : H₂O = 50 : 50; flow rate, 2 mL/min)를 실시하여 화합물 **7** (t_R 30.5 min, 4.2 mg)을 분리하였다. 소분획 ST310-18 (6.0 mg)을 RP-HPLC (YMC C18, MeCN : H₂O = 60 : 40; flow rate, 2 mL/min)를 실시하여 화합물 **6** (t_R 40.6 min, 0.8 mg)을 분리하였다. 소분획 ST312 (342 mg) 을 RP-MPLC (Biotage C18, MeOH : H₂O = 25 : 75 → MeOH : H₂O = 90 : 10)를 실시하여 총 20개의 소분획으로 나누었다 (ST312-01 ~ ST312-20). 이 중 소분획 ST312-

16 (17.0 mg)을 RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, MeOH : H₂O = 65 : 35; flow rate, 2 mL/min)를 실시하여 화합물 **8** (t_R 15.3 min, 1.0 mg)과 화합물 **1** (t_R 26.6 min, 7.4 mg)을 분리하였다. 소분획 ST314 (250 mg)를 RP-MPLC (Biotage C18, MeOH : H₂O = 30 : 70 → MeOH : H₂O = 90 : 10)를 실시하여 총 16개의 소분획으로 나누었다 (ST314-01 ~ ST314-16). 이 중 소분획 ST314-05 (4.2 mg)를 RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, MeCN : H₂O = 30 : 70; flow rate, 2 mL/min)를 실시하여 화합물 **20** (t_R 15.3 min, 1.0 mg)을 분리하였다. 소분획 ST314-07 (20.0 mg)을 RP-HPLC (Phenomenex Luna C18, MeCN : H₂O = 35 : 65; flow rate, 2 mL/min)를 실시하여 화합물 **11** (t_R 32.4 min, 1.0 mg)과 화합물 **12** (t_R 38.4 min, 1.0 mg)를 분리하였다. ST5를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (100 % *n*-hexane → *n*-hexane : EtOAc = 40 : 1 → *n*-hexane : EtOAc = 30 : 1 → *n*-hexane : EtOAc = 15 : 1 → *n*-hexane : EtOAc = 10 : 1 → *n*-hexane : EtOAc = 8 : 1 → *n*-hexane : EtOAc = 4 : 1 → *n*-hexane : EtOAc = 1 : 1 → *n*-hexane : EtOAc = 1 : 1 → CHCl₃ : MeOH = 1 : 1)를 실시해 총 39개의 분획으로 나누었다 (ST501 ~ ST539). 이 중 소분획 ST512 (44.0 mg)를 RP-HPLC (Inertsil ODS-3, MeOH : H₂O = 85 : 15 → MeOH : H₂O = 100 : 0, 40 min; flow rate, 3 mL/min)를 실시하여 화합물 **13** (t_R 11.9 min, 1.2 mg)을 분리하였다. 소분획 ST518 (67.8 mg)을 RP-HPLC (Inertsil ODS-3, MeOH : H₂O = 80 : 20 → MeOH : H₂O = 100 : 0 → MeOH : H₂O = 80 : 20, 50 min, 3 mL/min)를 실시하여 화합물 **2** (t_R 23.8 min, 4.2 mg)와 화합물 **3** (t_R 28.8 min, 3.4 mg)을 분리하였다. 소분획 ST519 (442 mg)를 RP-HPLC (Inertsil ODS-3, MeOH : H₂O = 80 : 20 → MeOH : H₂O = 100 : 0, 50 min, 3 mL/min)를 실시하여 화합물 **17** (t_R 15.1 min, 2.8 mg)을 분리하였다. 소분획 ST520 (72 mg)을 RP-HPLC (Inertsil ODS-3, MeOH : H₂O = 90 : 10 → MeOH : H₂O = 95 : 5 → MeOH : H₂O = 100 : 0, 60 min, 3 mL/min)를 실

시하여 화합물 **23** (t_R 26.9 min, 8.9 mg)을 분리하였다. 소분획 ST526 (300 mg)에 대해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 총 10개의 분획을 얻었다 (ST526-01 ~ ST526-10). 소분획 ST526-08 (72 mg)을 RP-HPLC (Inertsil ODS-3, MeOH : H₂O = 90 : 10 → MeOH : H₂O = 95 : 5 → MeOH : H₂O = 100 : 0, 60 min, 3 mL/min)를 실시하여 화합물 **15** (t_R 23.4 min, 4.7 mg)를 분리하였다 (Scheme 1).



Scheme 1. Isolation of compounds **1-23** from *n*-BuOH fraction of *S. tonkinensis* roots and rhizomes

Compound 1

Whitish amorphous powder

C₂₅H₂₈O₅ (m.w. 408)

HRESIMS: m/z 409.2009 [M+H]⁺ (calcd: 409.2015; error ppm: -1.5)

$[\alpha]_D^{20} +2.5^\circ$ (c 0.37, CHCl₃)

UV λ_{\max} (MeOH) (log ϵ) nm 288.5 (2.59), 318.5 (2.97), 396.5 (3.27)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ_H 7.58 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5), 7.12 (1H, s, H-6'), 6.50 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-6), 6.34 (1H, s, H-3'), 5.62 (1H, m, H-2), 5.28 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-2''), 5.22 (1H, t, J = 7.0 Hz, H-2''), 3.32 (2H, d, J = 7.0 Hz, H-1''), 3.20 (2H, d, J = 7.2 Hz, H-1''), 2.90 (1H, dd, J = 16.9, 12.5 Hz, H-3a), 2.76 (1H, dd, J = 16.8, 4.1 Hz, H-3b), 1.71 (3H, s, H-4''), 1.67 (3H, s, H-5''), 1.64 (3H, s, H-5''), 1.63 (3H, s, H-4'') ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 195.2 (C-4), 164.1 (C-7), 163.7 (C-9), 156.7 (C-4'), 154.3 (C-2'), 132.6 (C-3'''), 132.2 (C-3''), 128.6 (C-6'), 126.9 (C-5), 124.8 (C-2''), 123.5 (C-2'), 120.6 (C-5'), 118.3 (C-1'), 117.2 (C-8), 115.2 (C-10), 110.8 (C-6), 103.4 (C-3'), 76.6 (C-2), 44.2 (C-3), 28.8 (C-1'''), 26.2 (C-4''), 26.1 (C-4'''), 23.2 (C-1''), 18.2 (C-5''), 18.0 (C-5''') ppm

Compound 2

Whitish amorphous powder

C₂₂H₂₀O₆ (m.w. 380)

HRESIMS: m/z 381.1335 [M+H]⁺ (calcd: 381.1338; error ppm: -0.8)

$[\alpha]_D^{20} -162.7^\circ$ (c 0.54, CHCl₃)

CD [MeOH, nm ($\Delta\epsilon$): 330 (+0.03), 271 (-0.06), 237 (-0.76), 222 (-0.77)

UV λ_{\max} (MeOH) (log ϵ) nm 257.5 (2.44), 272 (2.46), 315.5 (2.55), 343 (2.92)

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} 6.74 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-1'), 6.73 (1H, s, H-7), 6.45 (1H, s, H-10), 6.40 (1H, s, H-4), 5.91 (2H, dd, $J = 11.5, 1.2$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 5.77 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-2'), 5.53 (1H, d, $J = 6.7$ Hz, H-11a), 4.18 (1H, dd, $J = 10.8, 5.0$ Hz, H-6), 3.83 (3H, s, OCH_3), 3.57 (1H, t, $J = 11.1$ Hz, H-6), 3.41 (1H, m, H-6a), 1.50 (3H, s, H-5'), 1.48 (3H, s, H-4') ppm

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 154.2 (C-10a), 149.9 (C-3), 149.5 (C-4a), 148.0 (C-9), 141.6 (C-8), 136.8 (C-2), 132.3 (C-2'), 121.5 (C-1), 119.2 (C-1'), 117.9 (C-6b), 106.8 (C-11b), 104.7 (C-7), 101.3 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), 100.6 (C-4), 93.9 (C-10), 76.7 (C-11a), 75.6 (C-3'), 66.2 (C-6), 56.0 (OCH_3), 40.2 (C-6a), 27.6 (C-4'), 27.5 (C-5') ppm

Compound 3

Whitish amorphous powder

$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_6$ (m.w. 382)

HRESIMS: m/z 383.1485 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd: 383.1495; error ppm: -2.6)

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} +157.1^\circ$ (c 0.3, CHCl_3)

CD [MeOH, nm ($\Delta\epsilon$): 330 (+0.03), 273 (-0.11), 237 (-1.67), 216 (-4.85)

UV λ_{\max} (MeOH) (log ϵ) nm 304.5 (2.66)

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ_{H} 6.72 (1H, s, H-7), 6.45 (1H, s, H-10), 6.37 (1H, s, H-4), 5.91 (2H, dd, $J = 10.4, 1.3$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 5.52 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-11a), 5.24 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2'), 4.15 (1H, dd, $J = 10.8, 5.0$ Hz, H-6), 3.85 (3H, s, OCH_3), 3.67 (1H, m, H-1'), 3.57 (1H, t, $J = 11.1$ Hz, H-6), 3.57 (1H, m, H-1'), 3.56 (1H, m, H-6a), 1.79 (3H, s, H-5'), 1.69 (3H, s, H-4') ppm

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{C} 154.2 (C-10a), 149.1 (C-4a), 148.0 (C-9), 147.7

(C-2), 141.6 (C-8), 138.4 (C-3), 132.0 (C-3'), 127.6 (C-1), 122.3 (C-2'), 118.2 (C-6b), 110.6 (C-11b), 104.7 (C-7), 101.2 (-OCH₂O-), 98.0 (C-4), 93.9 (C-10), 77.2 (C-11a), 66.1 (C-6), 55.9 (OCH₃), 43.3 (C-6a), 25.8 (C-4'), 25.4 (C-1'), 17.9 (C-5') ppm

Compound 4

Yellowsh needle

C₃₀H₃₆O₄ (m.w. 460)

HRESIMS: *m/z* 461.2696 [M+H]⁺ (calcd: 461.2692; error ppm: 0.9)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 7.75 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5), 7.07 (2H, s, H-2', H-6'), 6.54 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-6), 5.33 (3H, m, H-2, H-2'', H-2'''), 5.26 (1H, t, *J* = 6.4 Hz, H-2''), 3.42 (2H, d, *J* = 6.8 Hz, H-1''), 3.37 (4H, d, *J* = 6.8 Hz, H-1''', H-1'''), 3.00 (1H, dd, *J* = 15.2, 13.2 Hz, H-3a), 2.80 (1H, brd, *J* = 15.2 Hz, H-3b), 1.78 (12H, s, H-4'', 4''', 5'', 5'''), 1.75 (3H, s, H-5''), 1.74 (3H, s, H-4'') ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ_C 187.9 (C-4), 157.4 (C-7), 156.9 (C-9), 149.0 (C-4'), 131.2 (C-3'', 3'''), 130.8 (C-1', 3''), 126.8 (C-3', 5'), 123.4 (C-5, 2', 6'), 117.7 (C-2''), 117.2 (C-2'', 2'''), 111.0 (C-8), 110.6 (C-10), 106.5 (C-6) 75.7 (C-2), 40.2 (C-3), 25.8 (C-1'', 1'''), 21.9 (C-1''), 18.3 (C-5'', 5'', 5'''), 14.0 (C-4'', 4'', 4''') ppm

Compound 5

Yellowsh amorphous powder

C₂₅H₂₈O₄ (m.w. 392)

HRESIMS: *m/z* 393.2064 [M+H]⁺ (calcd: 393.3066 ; error ppm: -0.5)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ_H 7.58 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5), 7.19 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2'), 7.12 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, H-6'), 6.77 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5'), 6.50 (1H,

d, $J = 8.7$ Hz, H-6), 5.33 (1H, overlapped, H-2), 5.23 (1H, overlapped, H-2''), 5.18 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-2''), 3.30 (2H, overlapped, H-1'''), 3.29 (2H, overlapped, H-1''), 2.99 (1H, dd, $J = 16.9, 12.6$ Hz, H-3a), 2.71 (1H, dd, $J = 16.9, 3.1$ Hz, H-3b), 1.73 (3H, s, H-4'''), 1.70 (3H, s, H-5'''), 1.62 (3H, s, H-4''), 1.59 (3H, s, H-5'') ppm

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{C} 194.4 (C-4), 164.2 (C-7), 163.2 (C-9), 156.6 (C-4'), 133.4 (C-3'''), 132.3 (C-3''), 131.7 (C-1'), 129.6 (C-2'), 129.0 (C-3'), 126.9 (C-5), 126.1 (C-6'), 124.0 (C-2'''), 123.5 (C-2''), 117.3 (C-8), 115.8 (C-5'), 115.2 (C-10), 110.9 (C-6), 81.1 (C-2), 45.0 (C-3), 29.3 (C-1'''), 26.2 (C-4''), 26.2 (C-4'''), 23.1 (C-1''), 18.2 (C-5'''), 18.2 (C-5'') ppm

Compound 6

Yellowish amorphous powder

$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_5$ (m.w. 406)

HRESIMS: m/z 407.1852 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd: 407.1858 ; error ppm: -1.5)

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ_{H} 7.41 (1H, s, H-5), 7.28 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 6.37 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1''), 6.34 (1H, m, H-5'), 6.33 (1H, s, H-3'), 5.70 (1H, d, $J = 9.6$, H-2''), 5.64 (1H, brd, $J = 12.0$ Hz, H-2), 5.17 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-2'''), 2.98 (1H, dd, $J = 16.7, 13.2$, H-3a), 2.74 (1H, brd, $J = 16.7$ Hz, H-3b), 1.67 (3H, s, C-4'''), 1.64 (3H, s, C-5'''), 1.45 (3H, s, C-5''), 1.43 (3H, s, C-6'') ppm

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{C} 194.9 (C-4), 163.2 (C-7), 159.7 (C-8a), 158.8 (C-4'), 156.8 (C-6'), 132.3 (C-3'''), 130.6 (C-5), 128.7 (C-2'), 123.2 (C-3''), 123.1 (C-2'''), 122.7 (C-1'), 118.4 (C-4''), 118.3 (C-8), 117.0 (C-3'), 115.6 (C-5'), 107.7 (C-6), 103.4 (C-4a), 78.9 (C-3''), 76.5 (C-2), 44.1 (C-3), 28.8 (C-6''), 28.7 (C-5''), 26.0 (C-5'''), 22.9 (C-1'''), 18.2 (C-4''') ppm

Compound 7

Colorless amorphous powder

$C_{25}H_{28}O_5$ (m.w. 408)

HRESIMS: m/z 409.2014 $[M+H]^+$ (calcd: 409.2015; error ppm: -0.2)

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ_H 7.47 (1H, s, H-5), 7.28 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6'), 6.33 (1H, dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, H-5'), 6.32 (1H, s, H-3'), 5.59 (1H, dd, $J = 12.8, 2.8$ Hz, H-2), 5.32 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, H-2''), 5.17 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2'''), 3.35 (2H, brd, $J = 6.4$ Hz, H-1''), 3.26 (1H, brd, $J = 7.2$ Hz, H-1'''), 2.92 (1H, dd, $J = 16.8, 12.8$ Hz, H-3a), 2.71 (1H, dd, $J = 16.8, 3.2$ Hz, H-3b), 1.78 (3H, s, H-4''), 1.71 (3H, s, H-5''), 1.64 (3H, s, H-4''') 1.63 (3H, s, H-5''') ppm

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_C 193.8 (C-4), 160.5 (C-7), 160.1 (C-9), 158.1 (C-6'), 155.2 (C-4'), 132.9 (C-3'''), 131.1 (C-3''), 127.2 (C-1'), 125.5 (C-2'), 124.1 (C-5), 122.5 (C-2''), 121.8 (C-2'''), 117.2 (C-5'), 115.8 (C-3'), 113.4 (C-6), 106.2 (C-8), 101.9 (C-10), 74.9 (C-2), 42.7 (C-3), 27.5 (C-5''), 24.6 (C-5'''), 21.9 (C-1'', 1'''), 16.6 (C-4''), 16.4 (C-4''') ppm

Compound 8

Yellowish amorphous powder

$C_{30}H_{36}O_4$ (m.w. 460)

HRESIMS: m/z 461.2684 $[M+H]^+$ (calcd: 461.2692; error ppm: -1.7)

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ_H 7.61 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 7.09 (2H, s, H-2', 6'), 6.50 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6), 5.31 (1H, dd, $J = 13.1, 2.4$ Hz, H-2), 5.21 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2'''), 3.29 (2H, overlapped, H-1'''), 3.01 (1H, dd, $J = 16.8, 13.3$ Hz, H-3a), 2.67-2.74 (1H, overlapped, H-3b), 2.67-2.74 (4H, overlapped, H-1'', 1'''), 1.73-1.77

(4H, overlap, H-2'', 2'''), 1.63 (3H, s, H-4'''), 1.60 (3H, s, H-5'''), 1.26 (12H, s, H-4'', 4''', 5'', 5''') ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 194.5 (C-4), 153.9 (C-4'), 132.3 (C-3'''), 123.7 (C-2'''), 115.0 (C-9), 81.3 (C-2), 71.7 (C-3'', 3'''), 45.2 (C-3), 45.1 (C-2'', 2'''), 29.4 (C-4'', 4''', 5'', 5'''), 26.6 (C-1'', 1'''), 26.2 (C-4'''), 23.2 (C-1'''), 18.3 (C-5''') ppm

Compound 9

Colorless amorphous powder

C₁₆H₁₂O₅ (m.w. 284)

HRESIMS: m/z 285.0760 [M+H]⁺ (calcd: 285.0763; error ppm: -1.1)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ_H 7.26 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-1), 6.79 (1H, s, H-7), 6.48 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2), 6.37 (1H, s, H-10), 6.29 (1H, brd, H-4), 5.86 (2H, d, J = 10.4 Hz, -OCH₂O-), 5.44 (1H, d, J = 6.9 Hz, H-11a), 4.21 (1H, dd, J = 10.4, 4.6 Hz, H-6), 3.55 (1H, t, J = 10.4 Hz, H-6), 3.46 (1H, m, H-6a) ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 158.7 (C-3), 156.6 (C-4a), 153.1 (C-10a), 148.0 (C-9), 141.7 (C-8), 131.7 (C-1), 118.4 (C-6b), 111.4 (C-1a), 109.3 (C-2), 104.5 (C-7), 102.6 (C-4), 101.1 (-OCH₂O-), 92.8 (C-10), 78.6 (C-11a), 66.0 (C-6), 40.1 (C-6a) ppm

Compound 10

Colorless amorphous powder

C₁₆H₁₄O₄ (m.w. 270)

HRESIMS: m/z 271.0970 [M+H]⁺ (calcd: 271.0970; error ppm: 0)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ_H 7.29 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-7), 7.17 (1H, d, J = 8.4

Hz, H-1), 6.49 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$, H-8), 6.44 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-2), 6.38 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-4), 6.30 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-10), 5.47 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-11a), 4.22 (1H, dd, $J = 16.4, 10.4$, H-6), 3.74 (3H, s, OCH₃), 3.51-3.56 (2H, m, H-6, H-6a) ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 161.2 (C-9), 160.6 (C-10a), 158.7 (C-3), 156.6 (C-4a), 131.7 (C-1), 124.5 (C-7), 119.4 (C-6b), 111.4 (C-11b), 109.3 (C-2), 105.8 (C-8), 102.6 (C-4), 96.1 (C-10), 78.7 (C-11a), 66.1 (C-6), 54.5 (OCH₃), 39.5 (C-6a) ppm

Compound 11

Colorless amorphous powder

C₂₄H₂₄O₁₁ (m.w. 484)

HRESIMS: m/z 489.1403 [M+H]⁺ (calcd: 489.1397; error ppm: 1.2)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ_H 7.37 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-1), 6.80 (1H, s, H-7), 6.75 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 6.62 (1H, brs, H-4), 6.37 (1H, s, H-10), 5.87 (2H, $J = 15.6$ Hz, -OCH₂O-), 5.48 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-11a), 4.88 (1H, overlapped, H-1'), 4.39 (1H, d, $J = 11.6$, H-6'a), 4.24 (2H, m, H-6'b, H-6), 3.67-3.34 (7H, m, H-2', 3', 4', 5', 6, 6a), 2.03 (3H, s COCH₃) ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 172.8 (COCH₃), 160.1 (C-3), 157.9 (C-4a), 155.6 (C-10a), 149.6 (C-9), 143.2 (C-8), 133.0 (C-1), 119.6 (C-6b), 116.0 (C-11b), 111.9 (C-2), 106.0 (C-7), 105.7 (C-4), 102.6 (-OCH₂O-), 101.9 (C-1'), 94.3 (C-10), 79.7 (C-11a), 77.9 (C-5'), 75.4 (C-3'), 74.8 (C-2'), 71.7 (C-4'), 67.5 (C-6), 64.7 (C-6'), 41.6 (C-6a), 20.7 (COCH₃) ppm

Compound 12

Colorless amorphous powder

$C_{24}H_{26}O_{10}$ (m.w. 474)

HRESIMS: m/z 475.1589 $[M+H]^+$ (calcd: 475.1604; error ppm: -3.2)

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ_H 7.40 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-1), 7.17 (1H, d, J = 8.4, H-7), 6.77 (1H, dd, J = 8.4, 2.4 Hz, H-2), 6.63 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-4), 6.45 (1H, dd, J = 8.4, 2.0 Hz, H-8), 6.38 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-10), 5.51 (1H, d, J = 5.6 Hz, H-11a), 4.89 (1H, overlapped, H-1'), 4.39 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-6'a), 4.24 (2H, m, H-6, H-6'b), 3.74 (3H, s, OCH_3), 3.67-3.34 (7H, m, H-2', 3', 4', 5', 6, 6a), 2.02 (3H, s, $COCH_3$) ppm

Compound 13

Colorless amorphous powder

$C_{17}H_{14}O_5$ (m.w. 298)

HRESIMS: m/z 299.0918 $[M+H]^+$ (calcd: 299.0919; error ppm: -0.3)

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ_H 7.40 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-1), 6.72 (1H, s, H-7), 6.63 (1H, dd, J = 8.8, 2.8 Hz, H-2), 6.47 (1H, d, 2.4 Hz, H-4), 6.43 (1H, s, H-10), 5.90 (2H, d, J = 10.8 Hz, $-OCH_2O-$), 5.48 (1H, d, J = 6.8 Hz, H-11a), 4.23 (1H, dd, J = 10.8, 4.8 Hz, H-6), 3.79 (3H, s, OCH_3), 3.66 (1H, t, J = 11.2 Hz, H-6), 3.48 (1H, m, H-6a) ppm

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ_C 161.1 (C-3), 156.6 (C-4a), 154.3 (C-10a), 148.1 (C-9), 141.7 (C-8), 131.8 (C-1), 118.0 (C-6b), 112.4 (C-11a), 109.2 (C-2), 109.1 (C-7), 104.8 (C-4), 101.7 ($-OCH_2O-$), 93.9 (C-10), 78.6 (C-11a), 66.6 (C-6), 55.4 (OCH_3), 40.3 (C-6a) ppm

Compound 14

Whitish amorphous powder

$C_{22}H_{22}O_{10}$ (m.w. 446)

HRESIMS: m/z 447.1270 $[M+H]^+$ (calcd: 447.1291; error ppm: -4.7)

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ_H 7.37 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-1), 6.99 (1H, s, H-7), 6.71 (1H, brd, J = 8.8 Hz, H-2), 6.56 (1H, brs, H-4), 6.54 (1H, s, H-10), 5.93 (2H, d, J = 15.6 Hz, -OCH₂O-), 5.57 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-11a), 4.85 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1'), 4.28 (1H, dd, J = 7.0, 4.0 Hz, H-6), 3.70-3.14 (7H, m, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-6), 3.44 (1H, m, H-6a) ppm

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ_C 158.9 (C-3), 156.6 (C-4a), 154.1 (C-10a), 147.9 (C-9), 141.6 (C-8), 132.3 (C-1), 118.7 (C-6b), 114.6 (C-11b), 110.8 (C-2), 105.8 (C-7), 104.4 (C-4), 101.5 (-OCH₂O-), 100.7 (C-1'), 93.7 (C-10), 78.1 (C-11a), 77.5 (C-5'), 76.9 (C-3'), 73.6 (C-2'), 70.1 (C-4'), 66.3 (C-6), 61.1 (C-6'), 40.5 (C-6a) ppm

Compound 15

Yellowish amorphous powder

$C_{30}H_{34}O_4$ (m.w. 458)

HRESIMS: m/z 459.2525 $[M+H]^+$ (calcd: 459.2535; error ppm: -2.2)

1H -NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 7.74 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 7.04 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6'), 6.92 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.53 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6), 6.31 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-1'''), 5.63 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-2'''), 5.32 (1H, dd, J = 13.2, 2.8 Hz, H-2), 5.26 (2H, m, H-2'', H-2'''), 3.41 (2H, d, J = 7.2 Hz, H-1''), 3.28 (2H, d, J = 7.6 Hz, H-1'''), 3.02 (1H, dd, J = 12.6, 13.2 Hz, H-3b), 2.75 (1H, dd, J = 16.8, 2.8 Hz, H-3a), 1.73 (12H, m, CH₃ × 4), 1.43 (6H, CH₃ × 2) ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ_C 191.8 (C-4), 161.3 (C-7), 160.9 (C-9), 150.7 (C-4'), 135.1 (C-1'), 132.4 (C-3'''), 130.6 (C-3''), 130.1 (C-2'''), 129.3 (C-5'), 127.2 (C-6'), 126.5 (C-5), 122.4 (C-2'), 122.3 (C-1'''), 121.9 (C-2'', 2'''), 121.1 (C-3'), 120.9 (C-8), 114.9 (C-10), 114.5 (C-6), 110.4 (C-2), 79.7 (C-8''), 45.9 (C-3), 44.0 (C-1'''), 28.2 (C-5''), 28.1 (C-4''', 5''), 25.8 (C-5'''), 22.3 (C-1''), 17.9 (C-4''), 17.6 (C-4''') ppm

Compound 16

Yellowish amorphous powder

C₁₅H₁₂O₄ (m.w. 256)

HRESIMS: *m/z* 257.0815 [M+H]⁺ (calcd: 257.0814; error ppm: 0.4)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ_H 7.97 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-6'), 7.79 (1H, d, *J* = 15.2 Hz, H-β), 7.62 (1H, d, *J* = 15.2 Hz, H-α), 7.62 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.84 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3, 5), 6.41 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, H-5'), 6.28 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-3') ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 193.5 (C=O), 167.6 (C-4'), 166.8 (C-2'), 161.7 (C-4), 145.6 (C-β), 133.4 (C-6'), 131.9 (C-2, 6), 127.9 (C-1), 118.4 (C-α), 117.0 (C-3, 5), 114.6 (C-1'), 109.3 (C-5'), 103.9 (C-3') ppm

Compound 17

Whitish amorphous powder

C₂₁H₁₈O₆ (m.w. 366)

HRESIMS: *m/z* 367.1178 [M+H]⁺ (calcd: 367.1182 ; error ppm: -1.1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 6.74 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-4'), 6.72 (1H, s, H-7), 6.44 (1H, s, H-10), 6.43 (1H, s, H-4), 5.91 (2H, -OCH₂O-), 5.76 (1H, d, *J* = 10.2 Hz,

H-3'), 5.60 (1H, s, OH), 5.52 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-11a), 4.16 (1H, dd, $J = 11.2, 5.2$ Hz, H-6), 3.55 (1H, t, $J = 11.6$ Hz, H-6), 3.40 (1H, m, H-6a), 1.48 (3H, s, H-5'), 1.46 (3H, s, H-6') ppm

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{C} 154.2 (C-10a), 149.9 (C-4a), 148.1 (C-9), 146.1 (C-3), 141.7 (C-8), 134.3 (C-2), 132.1 (C-3'), 120.8 (C-6b), 119.3 (C-4'), 117.9 (C-1), 106.8 (C-11b), 104.7 (C-7), 103.2 (C-4), 101.3 (-OCH₂O-), 93.9 (C-10), 66.2 (C-6), 40.2 (C-6a), 27.8 (C-6'), 27.6 (C-5') ppm

Compound 18

Yellowish amorphous powder

$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (m.w. 268)

HRESIMS: m/z 269.0816 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd: 26.0814 ; error ppm: 0.7)

^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ_{H} 8.33 (1H, s, H-2), 7.97 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 7.50 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 6.99 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.93 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 6.85 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 3.79 (3H, s, OCH₃) ppm.

^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz): δ_{C} 174.5 (C-4), 162.8 (C-7), 158.9 (C-4'), 157.5 (C-9), 153.1 (C-2), 130.0 (C-2', 6'), 127.2 (C-5), 124.2 (C-1'), 123.1 (C-3), 116.4 (C-10), 115.3 (C-6), 113.6 (C-3', 5'), 102.1 (C-8), 55.2 (OCH₃) ppm

Compound 19

Yellowish amorphous powder

$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ (m.w. 270)

HRESIMS: m/z 271.0607 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd: 271.0606; error ppm: 0.4)

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ_{H} 8.05 (1H, s, H-2), 7.36 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'),

6.84 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3', 5'), 6.33 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, s, H-6) ppm

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{C} 182.3 (C-4), 166.2 (C-7), 163.9 (C-5), 159.8 (C-4'), 158.9 (C-9), 154.8 (C-2), 131.4 (C-2', 6'), 124.7 (C-3), 123.3 (C-1'), 116.3 (C-3', 5'), 106.3 (C-10), 100.2 (C-6), 94.8 (C-8) ppm

Compound 20

Yellowish amorphous powder

$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (m.w. 254)

HRESIMS: m/z 255.0658 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd: 255.0657; error ppm: 0.4)

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ_{H} 7.95 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 7.87 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6'), 6.93 (2H, d, $J = 8.9$, H-3', 5'), 6.92 (1H, overlapped, H-7), 6.89 (1H, dd, $J = 8.8$, 2.0 Hz, H-6), 6.66 (1H, s, H-3) ppm

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{C} 178.8 (C-4), 161.2 (C-2), 127.9 (C-5), 122.1 (C-1'), 115.6 (C-3'), 103.6 (C-3), 102.2 (C-8) ppm

Compound 21

Brownish amorphous powder

$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (m.w. 256)

HRESIMS: m/z 257.0808 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd: 257.0814; error ppm: -2.3)

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): δ_{H} 7.75 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-6'), 7.30 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-4), 7.10 (1H, s, H-3), 6.88 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5), 6.69 (1H, dd, $J = 8.4$, 2.1 Hz, H-7), 6.52 (1H, dd, $J = 8.6$, 2.4 Hz, H-5'), 6.48 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3'), 3.79 (3H, s, OCH_3) ppm

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): δ_{C} 159.5 (C-4'), 154.5 (C-2'), 153.9 (C-7a), 153.8 (C-

6), 151.0 (C-2), 125.8 (C-6'), 121.7 (C-4), 119.3 (C-5), 110.4 (C-1'), 104.1 (C-3'), 102.3 (C-3), 100.3 (C-5'), 96.1 (C-7), 53.4 (OCH₃) ppm

Compound 22

Brownish amorphous powder

C₁₅H₁₀O₅ (m.w. 270)

HRESIMS: m/z 271.0606 [M+H]⁺ (calcd: 271.0606; error ppm: 0)

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): δ_H 7.64 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6'), 7.05 (1H, s, H-2), 6.99 (1H, s, H-4), 6.91 (1H, s, H-7), 6.39 (1H, dd, J = 8.4, 2.4 Hz, H-5'), 6.36 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-3'), 5.93 (2H, brs, -OCH₂O-) ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): δ_C 159.5 (C-2'), 156.9 (C-4'), 154.6 (C-2), 150.0 (C-7a), 146.8 (C-6), 145.7 (C-5), 128.0 (C-6'), 124.8 (C-3a), 111.5 (C-1'), 108.0 (C-5'), 104.7 (C-3'), 103.8 (C-3), 102.4 (-OCH₂O-), 100.0 (C-4), 93.8 (C-7) ppm

Compound 23

Yellowish needle

C₃₀H₃₆O₄ (m.w. 460)

HRESIMS: m/z 461.2961 [M+H]⁺ (calcd: 461.2962; error ppm: -0.2)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 13.9 (1H, s, C-2'-OH), 7.81 (1H, d, J = 15.4 Hz, H- β), 7.74 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-6'), 7.42 (1H, d, J = 15.4 Hz, H- α), 7.29 (2H, s, H-2, 6), 6.42 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-5'), 6.08 (1H, brs, OH), 5.73 (1H, s, OH), 5.31 (3H, m, H-2'', 2''', 2'''), 3.48 (2H, d, J = 6.0 Hz, H-1''), 3.38 (4H, m, H-1''', 1'''), 1.84 - 1.77 (18H, m, CH₃ \times 6) ppm

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ_C 192.2 (C=O), 163.9 (C-2'), 161.4 (C-4'), 155.5 (C-4),

144.9 (C-β), 135.9 (C-2), 135.1 (C-6), 129.2 (C-6'), 128.7 (C-α), 127.2 (C-1), 121.4 (C-1'), 121.2 (C-3), 117.5 (C-5), 114.1 (C-3'), 114.0 (C-2''), 107.6 (C-5'), 29.6 (C-5'', 5'''), 25.8 (C-1''', 1'''), 21.8 (C-1''), 18.0 (C-4'', 4''', 4''') ppm

4. 활성측정

4.1. *In vitro* 기도수축 억제

사용하는 약물은 모두 DMSO에 200배 농도로 용해하여 사용하였다. 시험동물로는 Hartley계 350 ~ 450 g의 수컷 기니픽 (SLC Japan)을 사용하였다. 기니픽 수동 감작을 위한 항혈청 (anti-OVA antiserum) 조제를 위해 먼저 실험실 환경에 안정화된 기니픽을 0, 7, 14일에 ovalbumin (OVA) 50 µg + alum (Thermo Scientific, USA) 500 µg 혼합액을 0.2 ml씩 복강내에 투여하여 감작하였다. 최종 감작 10일 후에, 기니픽을 마취하고 복대동맥에서 혈액을 채취하였다. 상온에서 혈액을 응고 시킨 후 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 항혈청(anti-OVA antiserum)으로 분리하여 -70℃에 보관하였다. 수동피부 반응을 사용하여 48시간의 역가를 측정한다. 결과, anti-OVA antiserum의 역가는 1000 ~ 3000 사이인 것으로 나타났다. 기니픽에서 얻은 항혈청을 기니픽의 귀정맥을 통해 1.5 ml/kg로 주사하여 감작시켰다. 48시간 후 기니픽을 실험치사시키고 기관지를 적출하여 Krebs-Henseleit액으로 채워진 organ bath에 1 g의 장력으로 현수하였다. 20분 간격으로 배지를 교환하면서 37℃에서 60 ~ 75분간 안정화한 후 carbachol (100 µg/ml)로 2회 수축을 유도하였다. 수축은 force transducer (Biegestab K30 Type 351, Hugo Sachs Elektronik, March/Freiburg, Germany)와

transducer coupler (Type A, Coulborn Instruments, PA, USA)를 사용하여, AcqKnowledge (Biopac Systems, MP150) 소프트웨어를 사용하여 기록 및 결과 분석을 수행하였다. 새로운 Krebs-Henseleit액에서 안정화시킨 후, 시험물질을 가하고, 5분 후 OVA (1 mg/ml)를 가해 수축을 유도하였다. OVA를 가하기 30분전에 indomethacin을 2 μ M을 가하여 prostanoids에 의한 영향을 배제하였다. 기관지 수축율은 carbachol에 의한 수축을 100%로 하여 percentage를 계산하였다. OVA에 의한 수축을 30분간 관찰한 후, carbachol를 가해 carbachol에 의한 수축이 재현되는지를 확인하였다.

4.2. *In vivo* 아라키돈산 유발 귀부종 억제

ICR계 20 ~ 30 g의 수컷 마우스 (SLC, Japan)를 사용해 Ryu et al.에 의해 기술된 방법을 변형하여 진행하였다 (Ryu et al., 2010). 약물 경구투여 한 시간 후에 2% 아라키돈산을 오른쪽 귀에 도포하고 1시간 후 dial thickness guage 로 귀두께를 측정하였다. 부종이 유발되지 않은 좌측 귀 대비 우측귀의 두께 증가율을 비교해 억제율을 계산하였다.

4.3. *In vivo* 기도염증 억제

시험동물로는 murine asthma model 시험에 널리 사용되는 BALB/c female mouse (Charles River Japan)를 안정화 후에 사용하였다. 실험실 환경에 안정화된 BALB/c 마우스를 0, 7, 14일에 ovalbumin (Sigma) 50 μ g + alum (Thermo Scientific, USA) 500 μ g 혼합액을 0.2 ml씩 복강내에 투여하여 감작하였다. 군당 6 ~ 8마리로 군분리한 후 22일과 24일에 1% OVA

를 50분간 흡입시켜 천식 염증을 유발하였다. 비유발군 (NC)의 경우, 감각은 하였지만, 1% OVA 분무를 수행하지 않았다. 각 개체의 시험물질의 투여 액량은 투여 당일의 체중을 기준으로 산출하였다. 약물은 22일 ~ 24일에 2회/일로 총 6회 마우스 경구투여용 존데를 사용하여 경구 투여하였다. 유발대조군의 경우 현탁 매질인 1% CMC를 경구로 투여하였다. 25일째에 마우스를 과마취사시킨 후, Phosphate buffered saline으로 폐기관지를 세척하여 세척액을 모아, 세척액중의 백혈구수를 Hematology analyzer (Melet Schloesting MS9-5V, France)로 측정하였다. 백혈구 분별계수를 위해 Diff Quik (Blood staining solution for differential diagnosis) 염색약으로 염색한 후, 호산구의 비율을 측정하였다. 폐는 적출하여 10% 포르말린액에 고정한 후 H&E 염색과 PAS 염색을 통해, 혈관 및 세기관지 주변으로의 염증 세포 침윤, 폐포염 및 술잔세포 증식을 각 0~3점 척도로 염증 정도를 평가하였다.

4.4. *In vitro* IL-6 생성 억제

분리한 화합물들을 100% DMSO에 녹인후 최종 농도가 0.16과 20 μ M이 되도록 순차적으로 희석하여 사용하였다. HMC-1 (KRIBB, Korea) 세포주를 24-well 배양판에 1×10^6 cell/ml 농도로 분주하고 PMA와 ionophore A23187로 자극하기 30분전에 각 화합물을 투여하였다. 24시간 배양후 상등액을 취해 원심분리하고 ELISA kit (BD Bioscience, USA)을 사용해 생성된 IL-6 양을 측정하였다.

4.5. *In vivo* 기도수축 억제

4.5.1. OVA-유발 기도수축 억제

약물은 1% CMC에 10 ml/kg가 되도록 현탁하여 사용하였다. 시험동물은 기니픽에서 얻은 항혈청을 400 ~ 500 g의 기니픽의 귀정맥을 통해 1.5 ml/kg로 투여하여 감작시키고 48시간 후에 시험에 사용하였다. 기니픽을 plethysmograph box (Type 855, Hugo Sachs Elektronik, Germany)에 넣고 각종 호흡 지표를 측정하였다. 약 10분간 안정기 호흡을 측정한 후 1.5% OVA를 2분간 분무하여 기도 수축을 유발하였다. 약물은 OVA 분무 1시간 전에 경구 투여하였다. 경구 투여 30분 후에 과민반응에 의한 치사를 예방하기 위하여 실험동물에 mepyramine (0.5 mg/kg), propranolol (0.05 mg/kg)을 피하 주사하였다.

4.5.2. SRS-A 의존형 기도수축 억제

약물은 1% CMC에 10 ml/kg가 되도록 현탁하여 사용하였다. 시험동물은 기니픽에서 얻은 항혈청을 400 ~ 500 g의 기니픽의 귀정맥을 통해 1.5 ml/kg로 투여하여 감작시키고 48시간 후에 시험에 사용하였다. 기니픽을 plethysmograph box (Type 855, Hugo Sachs Elektronik, Germany)에 넣고 각종 호흡 지표를 측정하였다. 약 10분간 안정기 호흡을 측정한 후 1.5% OVA를 2분간 분무하여 기도 수축을 유발하였다. 약물은 OVA 분무 1시간 전에 경구 투여하였으며, SRS-A 의존성 기도 수축을 유발하기 위해 OVA 분무 30분전에 mepyramine 10 mg/kg, propranolol 0.1 mg/kg, indomethacin 10 mg/kg을 피하로 투여하였다.

4.6. 통계 분석

시험군간의 통계학적 유의성을 검증하기 위해 Sigma stat (version 2.3)을 이용하여 ONA-way ANOVA 및 Dunnet 테스트를 수행하였다. Saline군과 유발군의 비교를 위해서는 t-test를 수행하였다. 유발군 (CMC 투여군)과 비교하여 $p < 0.05$ 인 것을 통계학적으로 유의한 것으로 인정하였다.

5. 기전연구

각 억제율 곡선에 대한 non-linear regression analysis를 통해 IC_{50} 값을 계산하였으며, 이를 위해 Math-IQ™ (ID Business Sections Ltd., UK)을 이용하였다. 각 약물의 억제율은 아래의 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \{1 - (c-a) / (b-a)\} \times 100$$

a: average cpm or spectrophotometric of nonspecific binding

b: average cpm or spectrophotometric of total binding

c: cpm or spectrophotometric in the presence of test compound

5.1. 5-Lipoxygenase (5-LO) 억제

human PBML cell은 헤파린 처리된 혈액을 $1000 \times g$ 에서 원심분리하고 중간 buffy coat에서 cell을 얻는다. RPMI 1640 배지에 재분산한 뒤 실온에서 15분간 $1000 \times g$ 에서 원심분리하여 중간층에서 세포를 얻는다.

RPMI 1640 배지로 세번 세척한뒤 사용한다. 이후 약물과 vehicle을 처리하여 37℃에서 15분 preincubation 하고 아라키돈산을 처리한다, 생합성은 DMSO에 녹여진 calcium ionophore A23187에 의해 개시되며 15분간 반응후 ice cooling으로 반응을 종결한다. 3℃에서 10분간 $2,500 \times g$ 에서 원심분리하고 MeOH을 넣은뒤 다시 30분 동안 $1,800 \times g$ 에서 원심분리하고 LTB₄ 의 양을 측정하였다 (Carter et al., 1991; Gudipaty et al., 2001).

5.2. Phosphodiesterase 3 (PDE3) 억제

human platelets에 incubation buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH7.5)와 PDE enzyme과 약물 및 vehicle을 섞어 25℃에서 15분 preincubation 시킨다. PDE substrate($1.01 \mu\text{M}$ [³H]cAMP+cAMP)를 첨가하여 25℃에서 20분 반응시키고 100℃에서 PDE enzyme 반응을 멈춘 후 [³H]Adenosine 양을 측정하였다 (Hidaka et al., 1976a).

5.3. Phosphodiesterase 4 (PDE4) 억제

U-937 cell에 incubation buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH7.5)와 PDE enzyme과 약물 및 vehicle을 섞어 25℃에서 15분 preincubation 시킨다. PDE substrate($1.01 \mu\text{M}$ [³H]cAMP+cAMP)를 첨가하여 25℃에서 20분 반응시키고 100℃에서 PDE enzyme 반응을 멈춘 후 [³H]Adenosine 양을 측정하였다 (Shepherd et al., 2004 ; Hidaka et al., 1976a).

5.4. Thromboxane synthase (TxS) 억제

응고제 처리된 human blood를 취하여 platelets에 약물과 vehicle을 넣고 15분 동안 25℃에서 preincubation하여, PGH₂를 첨가하여 교반상태에서 반응을 시킨다. 3분 동안 반응시킨 후 Thromboxane B₂의 양을 측정하였다 (Börsch-Haubold et al., 1998).

6. 배치간 유사도 평가

비임상 및 임상 시험에 사용된 9개 주요 배치에 대해 HPLC-DAD 분석을 통해 성분 프로파일의 동등성을 시험하였다. 각 시료는 10 mg/mL의 농도가 되도록 100% 메탄올에 녹인 후 0.2 µm nylon syringe filter로 여과하여 사용하였다. 분석은 YMC Hydrosphere C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) 컬럼을 사용해 이동상 A (0.1% phosphoric acid in water)와 이동상 B (MeCN)를 아래 표 (Table 1)와 같은 gradient 조건으로 흘려주었다. 유속은 1.0 ml/min, 컬럼온도는 30℃, 주입량은 10 µl, 검출기 파장은 210 nm로 설정하였다.

Table 1. Mobile phase condition for HPLC-DAD analysis

시간 (분)	0	60	70	90	105	106	120
이동상 A	90	60	50	0	0	90	90
이동상 B	10	40	50	100	100	10	10

HPLC-DAD에서 0.4초 간격으로 UV 흡광도를 측정하여 run time 120분인 시료 1개 당 18,000개의 data point를 얻었다. 9개 시료의 chromatographic data를 수치로 변환하여 18000 × 9의 행렬을 얻었다. 이로부터 평균

chromatogram을 구하고 전체 면적값 대비 0.2% 이상 peak을 대상으로 각 시료의 Pearson correlation coefficient를 구하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 산두근 활성 분획의 성분분리 및 구조규명

1.1. 산두근 및 활성 분획 선정배경

항천식 활성을 갖는 후보생약을 찾기 위해 다양한 문헌 및 database 검색을 통해 30종의 생약을 선정하였다. 이후 1차 스크리닝으로서 *in vitro* 기도수축 억제 시험을 농도를 낮춰가며 실험하였고 양성 대조군인 motelukast보다 우수한 약효를 보인 4종의 생약을 최종 선정하였다. 이후 2차 스크리닝으로서 *in vivo* 아라키돈산 유발 귀부종 모델을 사용하여 가장 우수한 활성을 보인 산두근 (*Sophora tonkinensis* Gagnepain roots and rhizomes)을 최종 후보생약으로 선정하였다 (data not shown). 이후 산두근 분획의 활성을 추적하고자 50% 에탄올 추출물을 감압농축해 에탄올을 제거한 상태에서 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH을 순차적으로 분획한 분획물들과 50% 에탄올 추출물을 감압농축해 에탄올을 제거한 상태에서 *n*-BuOH로 직접 분획한 분획물을 제조하였다. 이후 leukotriene 염증반응과 관련된 *in vivo* 아라키돈산 유발 귀부종 모델과 알러지성 기관지 천식염증과 관련된 *in vivo* murine asthma 모델에서 염증억제 효능을 측정하였다. 시험결과 두가지 모델에서 가장 염증억제 효과가 우수한 분획은 산두근 50% 에탄올 조추출물에 대해 순차적 분획을 거치지 않은 *n*-BuOH 분획이었다 (data not shown). 따라서 본 *n*-BuOH을 가지고 성분연구 및 약효 연구를 진행하기로 하였다.

1.2. 성분 분리

산두근 *n*-BuOH 분획에 대해 7종의 isoprenylated flavanone, 9종의 pterocarpan, 2종의 isoflavone, 1종의 flavones, 2종의 2-aryl benzofuran, 2종의 chalcone계 화합물을 분리하였다. 분리한 화합물의 이화학적 특성 및 분광학적 분석과 참고문헌과의 비교를 바탕으로 화합물 **1-23**을 2'-hydroxyglabrol (2,3-dihydro-7-hydroxy-2-[2,4-dihydroxy-3-(3-methyl-2-buten-1-yl)phenyl]-8-(3-methyl-2-buten-1-yl)-4*H*-1-benzopyran-4-one) (**1**), 3-methylmaackiapterocarpan B (3-methoxy-8,9-methylenedioxy-2,2-dimethylpyrano[5',6':1,2]-[6*aR*,11*aR*] pterocarpan) (**2**), 2-hydroxy-1-prenyl-pterocarpin (3-methoxy-8,9-methylenedioxy-1-(3-methylbut-2-en-1-yl)-[6*aR*,12*aR*]pterocarpan-2-ol) (**3**), sophoranone (**4**), glabrol (**5**), 2-(2',4'-dihydroxy-phenyl)-8,8-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-8*H*-pyrano[2,3-*d*]chroman-4-one (**6**), 6,8-diprenyl-7,2',4'-trihydroxyflavanone (**7**), tonkinochromane A (**8**), maackiain (**9**), medicarpin (**10**), maackiain-3-*O*-glucoside 6"-acetate (**11**), medicarpin 3-*O*-glucoside 6"-acetate (**12**), pterocarpin (**13**), trifolirhizin (**14**), sophoranochromene (**15**), isoliquiritigenin (**16**), maackiapterocarpan B (**17**), formononetin (**18**), genistein (**19**), 7,4'-dihydroxyflavone (**20**), bolusanthin IV (**21**), 2-(2',4'-dihydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxybenzofuran (**22**), sophoradin (**23**)으로 결정하였다 (Figure 4). 이중 화합물 **1**, **2**, 및 **3**은 천연에서 처음 분리, 보고되는 물질이다.

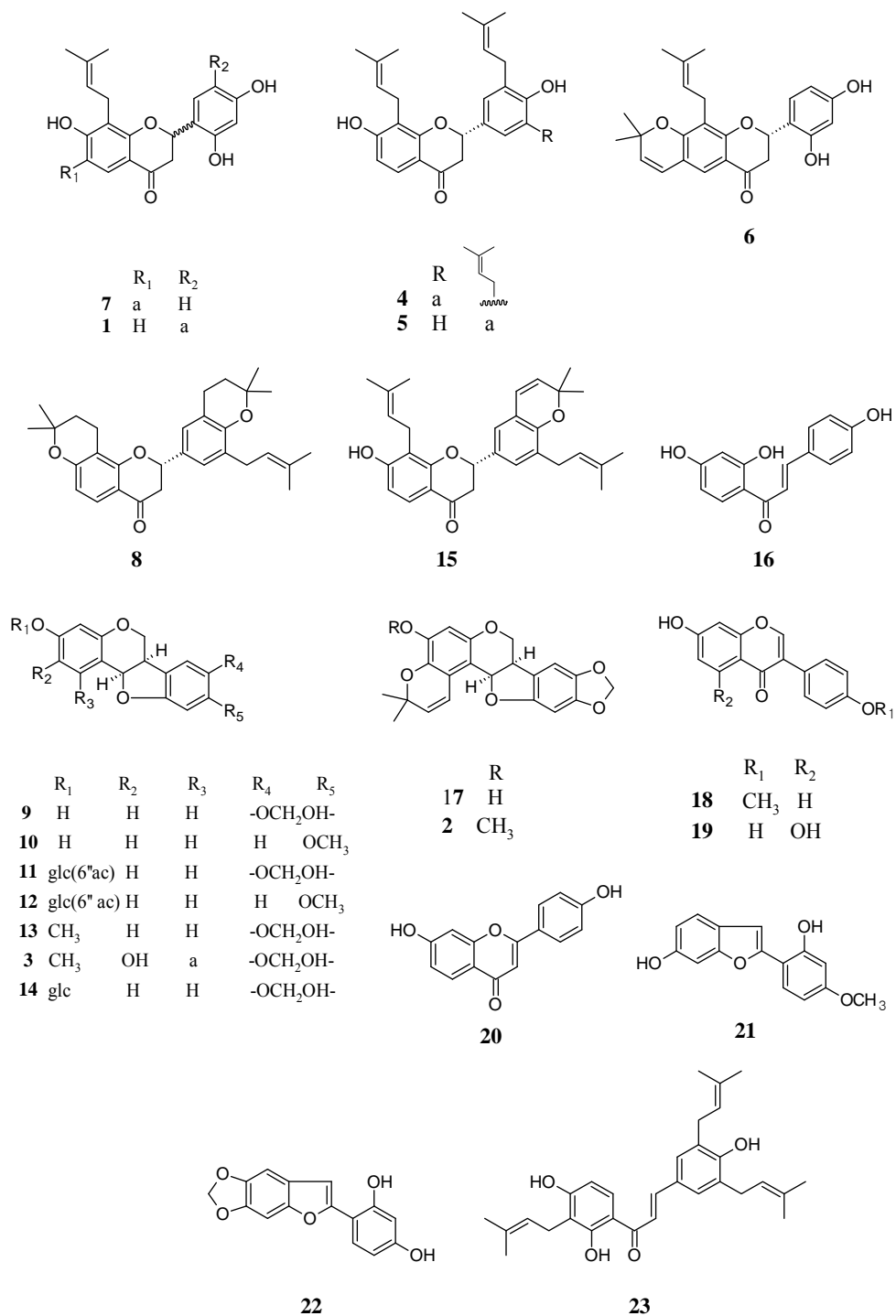


Figure 4. The structures of compounds **1** – **23** isolated from *n*-BuOH fraction of *S. tonkinensis*

1.3. 화합물 1의 구조

화합물 1은 흰색의 무정형 분말로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 409.2209 $[M+H]^+$ (calcd: 409.2015; error ppm: - 1.5)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{25}H_{28}O_5$ (m.w. 408)로 추정하였다. 1H -NMR data에서 화합물 1은 δ_H 5.62 (1H, m, H-2), 2.90 (1H, dd, J = 16.9, 12.5 Hz, H-3a), 2.76 (1H, dd, J = 16.8, 4.1 Hz, H-3b)의 특징적인 signal이 나타나 flavanone 골격을 가짐을 알 수 있었다. 또한 δ_H 3.32 (2H, d, J = 7.0 Hz, H-1"), 5.22 (1H, t, J = 7.0 Hz, H-2"), 1.63 (3H, s, H-4"), 1.64 (3H, s, H-5"), 3.20 (2H, d, J = 7.2 Hz, H-1'''), 5.28 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-2'''), 1.71 (3H, s, H-4'''), 1.67 (3H, s, H-5''') signal로부터 2개의 isoprenyl group이 치환되어 있음을 알 수 있었고, δ_H 7.58 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5)과 6.50 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-6)의 signal로부터 A ring에 2개의 *ortho*-coupled proton이 존재함을 알 수 있었다. 아울러 δ_H 6.34 (1H, s, H-3'), and 7.12 (1H, s, H-6')에서 2개의 singlet aromatic signals이 존재함을 알 수 있었는데 *meta*-coupled proton들이 관찰되지 않고 A ring 치환형태에 따른 chemical shift 및 2개의 aromatic singlet을 고려하면 A ring의 8번 position에 isoprenyl group이 있어야 함을 알 수 있었다. 또한 고립된 *para*- 치환상태로 aromatic proton이 배치되어야 함으로 화합물 1은 glabrol (화합물 5)과 유사한 구조임을 알 수 있었다 (Figures 5 and 6). 1H -NMR data에서 확인한대로, ^{13}C -NMR data에서 C-4의 chemical shift가 δ_C 195.2에서 확인되므로 flavanone 골격의 화합물임을 추정할 수 있었다 (Figure 7). 4개의 oxygenated quaternary carbon이 확인되어 aromatic ring에 결합된 oxygen은 4개임을 알 수 있었다. HMBC spectral data를 통해 isoprenyl group 중 하나는 1"과 correlation이 있는 A ring의 C-8에 나머지

하나는 H-6'과 C-2, C-2', C-4', H-6'과 C-1''' 및 H-1''' 및 C-4'의 correlation으로부터 C-5'에 결합되어 있는 것을 확인하였다 (Figure 8). CD spectroscopic data에서 명확한 cotton effect가 나타나지 않아 C-2의 absolute configuration은 결정할 수 없었다 (data not shown). 이상의 data로부터 화합물 **1**을 2'-hydroxyglabrol (2,3-dihydro-7-hydroxy-2-[2,4-dihydroxy-3-(3-methyl-2-buten-1-yl)phenyl]-8-(3-methyl-2-buten-1-yl)-4*H*-1-benzopyran-4-one)로 결정하였고 이는 천연에서 처음 분리, 보고되는 물질이다.

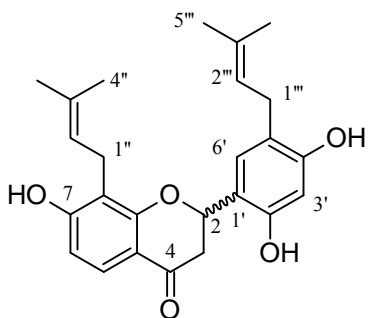


Figure 5. The chemical structure of compound **1**

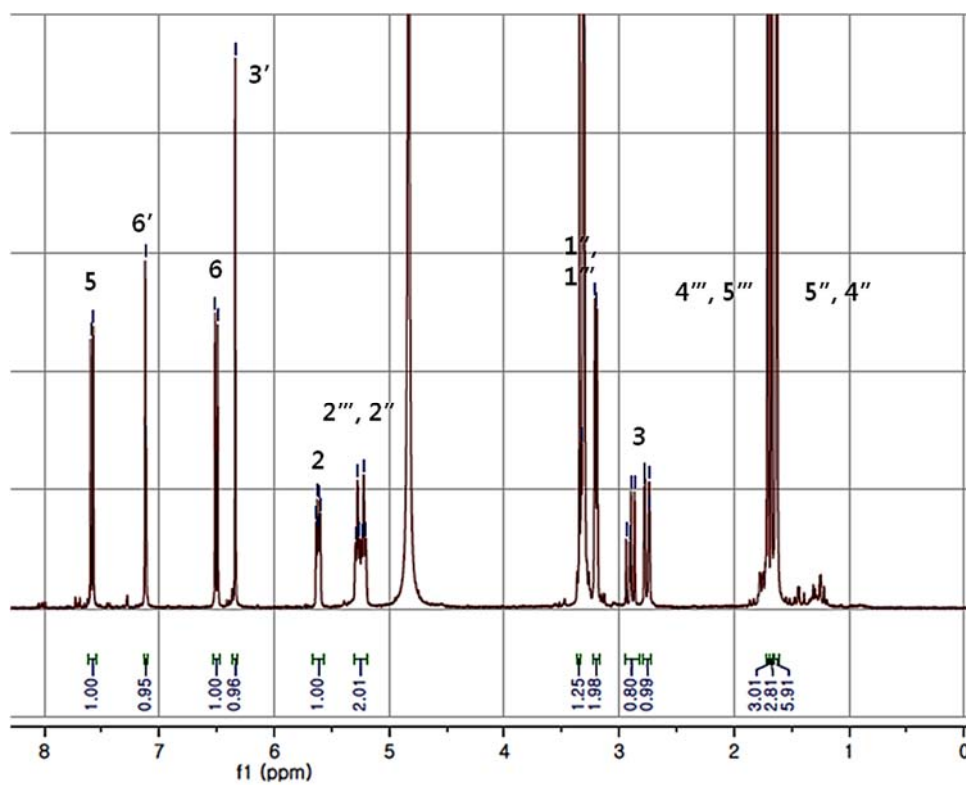


Figure 6. ^1H -NMR spectrum of compound **1** (400 MHz, CD_3OD)

1.4. 화합물 2의 구조

화합물 2는 흰색의 무정형 분말로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 381.1335 $[M+H]^+$ (calcd: 381.1338; error ppm: - 0.8)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{22}H_{20}O_6$ (m.w. 380)로 추정하였다. 1H -NMR data에서 화합물 2는 δ_H 4.18 (1H, dd, J = 10.8, 5.0 Hz, H-6), 3.57 (1H, t, J = 11.1 Hz, H-6), 3.41 (1H, m, H-6a), 5.53 (1H, d, J = 6.7 Hz, H-11a), 5.91 (2H, dd, J = 11.5, 1.2 Hz, -OCH₂O-)의 특징적인 signal을 보이는데 이로부터 기분리한 화합물 13과 같은 methylenedioxy기를 갖는 pterocarpan 골격임을 유추할 수 있었다. 또한 δ_H 6.74 (1H, d, J = 9.7 Hz, H-1'), 5.77 (1H, d, J = 9.7 Hz, H-2'), 1.48 (3H, s, H-4'), 1.50 (3H, s, H-5')의 signal로부터 2,2-dimethylpyran ring이 존재함을 알 수 있었다 (Figures 9 and 10). 화합물 2의 1H 및 ^{13}C -NMR data는 δ_H 3.83의 aromatic methoxy기를 제외하고 화합물 17 (maackiapterocarpan B)와 거의 동일하였다. 또한 ^{13}C -NMR data로부터 aromatic ring에 5개의 oxygenated olefin quaternary carbon이 있음을 재확인 하였다 (Figure 11). 화합물 2의 methoxy기의 치환 위치를 알기 위해 HMBC data를 얻었고 δ_H 3.83 과 δ_C 149.9 (C-3)의 correlation 확인을 통해 3번 위치에 결합되어 있음을 확인하였다 (Figure 12). C-6a과 C-11a의 absolute configuration은 maackiapterocarpan B의 것과 일치하여 (Li et al., 2009) 각각 *R*, *R* 형태로 결정하였다 (Figure 13). 따라서 화합물 2를 3-methylmaackiapterocarpan B (3-methoxy-8,9-methylenedioxy-2,2-dimethyl-pyrano[5', 6' : 1, 2]-[6a*R*,11a*R*] pterocarpan)로 결정하였고 이는 천연에서 처음 분리, 보고되는 물질이다.

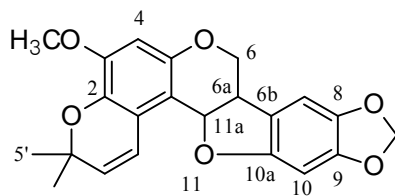


Figure 9. The chemical structure of compound **2**

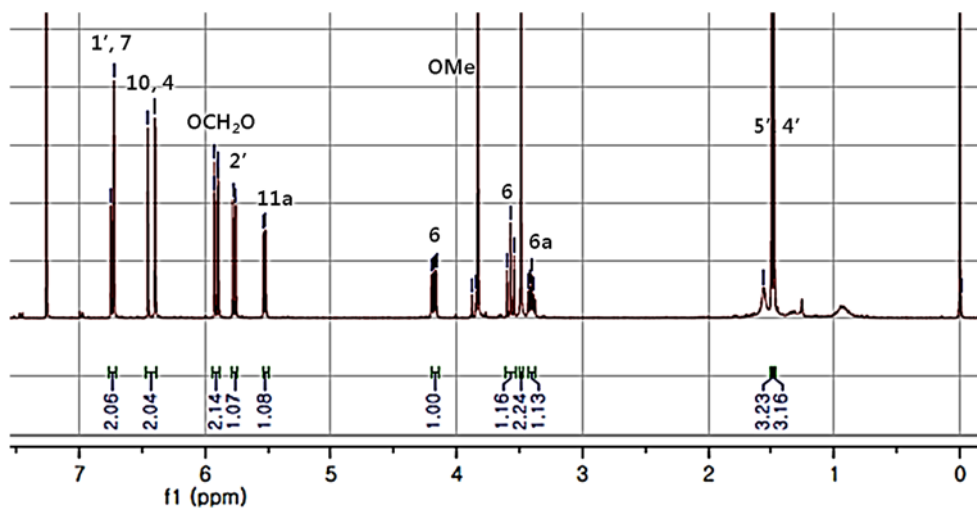


Figure 10. ¹H-NMR spectrum of compound **2** (400 MHz, CDCl₃)

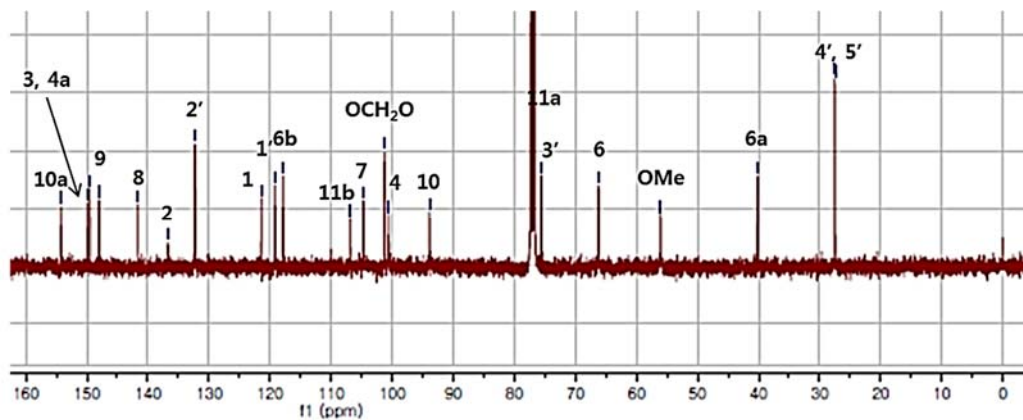


Figure 11. ¹³C-NMR spectrum of compound **2** (100 MHz, CDCl₃)

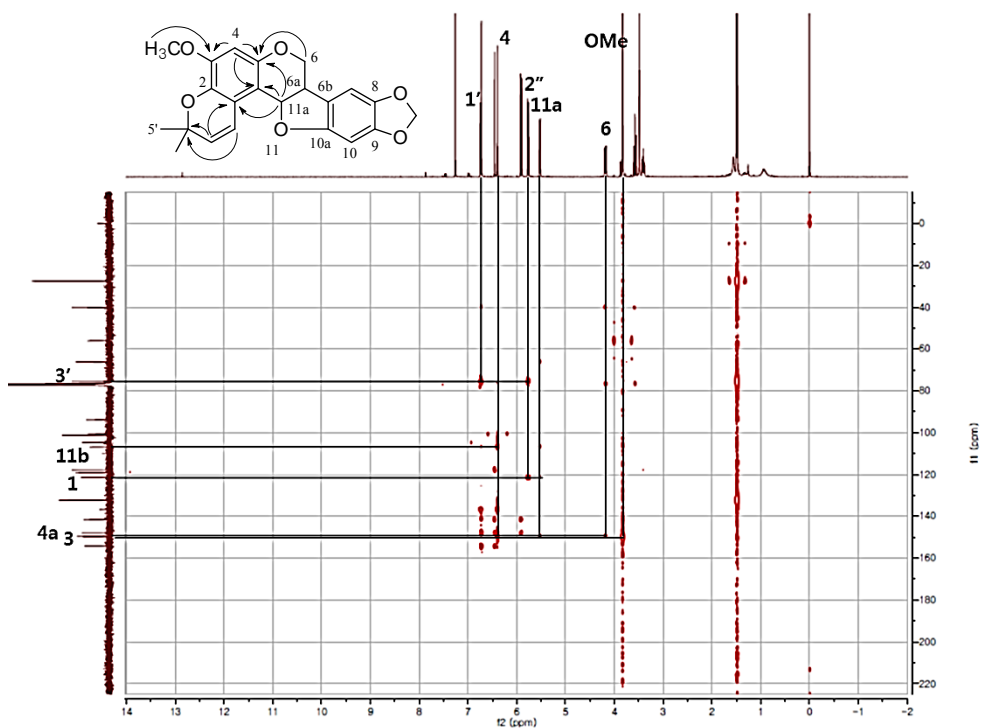


Figure 12. HMBC spectrum of compound 2

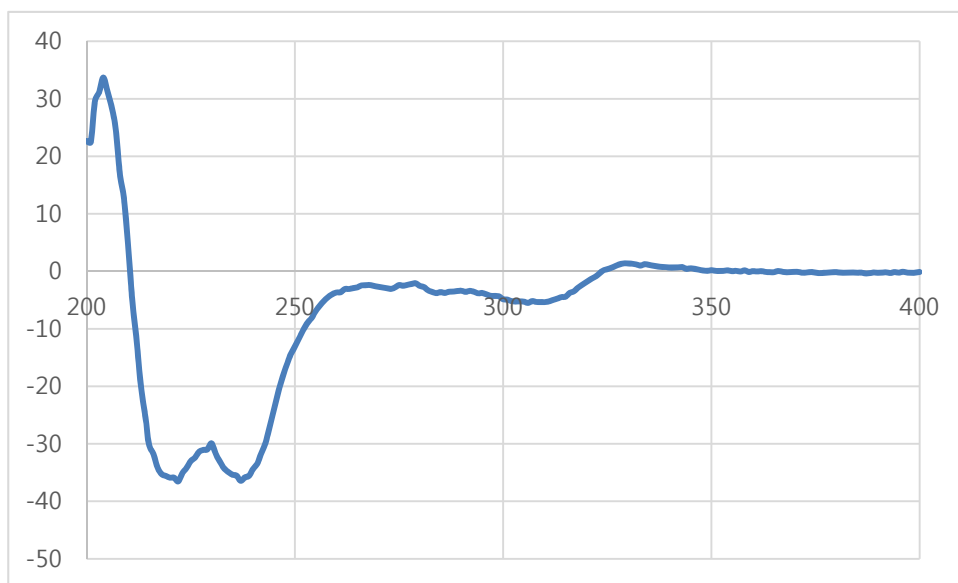


Figure 13. CD spectrum of compound 2

1.5. 화합물 3의 구조

화합물 3은 흰색의 무정형 분말로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 383.1485 $[M+H]^+$ (calcd: 383.1495; error ppm: - 2.6)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{22}H_{22}O_6$ (m.w. 382)로 추정하였다. 1H -NMR data로부터 δ_H 3.67 (1H, m, H-1'), 3.57 (1H, m, H-1'), 5.24 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2'), 1.69 (3H, s, H-4'), 1.79 (3H, s, H-5'), ^{13}C -NMR data로부터 δ_C 25.4 (C-1'), 122.3 (C-2'), 132.0 (C-3'), 25.8 (C-4'), 17.9 (C-5')의 isoprenyl group을 확인하였다. 1H -NMR data에서 화합물 3은 aromatic 영역의 3개 singlet signal로부터 coupling이 없는 독립된 3개의 proton이 존재해야 하는데 화합물 2나 화합물 9의 경우처럼 7번 및 10번 위치의 독립된 2개 proton을 제외하면 사실상 1개의 proton이 남게 되며 이로부터 2,2-dimethylpyran ring 대신 존재하는 isoprenyl group을 제외하고 화합물 2의 골격과 매우 유사함을 추론하였다 (Figures 14 and 15). 또한 ^{13}C -NMR data로부터 aromatic ring에 5개의 oxygenated olefin quaternary carbon이 있음을 재확인 하였다 (Figure 16). 화합물 3의 isoprenyl group의 치환 위치를 알기 위해 HMBC data를 얻었고 δ_H 3.57~ 3.67 (H-1') 과 δ_C 127.6 (C-1), 110.6 (C-11b)의 correlation 확인을 통해 1번 위치에 결합되어 있음을 확인하였다 (Figure 17). C-6a 및 C-11a의 absolute configurations은 CD spectral data를 화합물 2의 문헌치 (Li et al., 2009)와 비교해 각각 *R, R* configuration 임을 확인하였다 (Figure 18). 따라서 화합물 3을 2-hydroxy-1-prenyl-pterocarpin (3-methoxy-8,9-methylenedioxy-1-(3-methylbut-2-en-1-yl)-[6a*R*,12a*R*]pterocarpan -2-ol)로 결정하였고 이는 천연에서 처음 분리, 보고되는 물질이다.

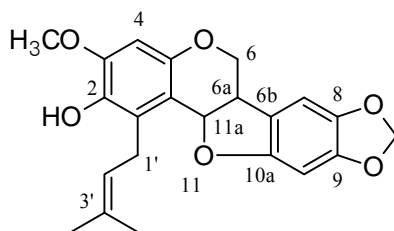


Figure 14. The chemical structure of compound **3**

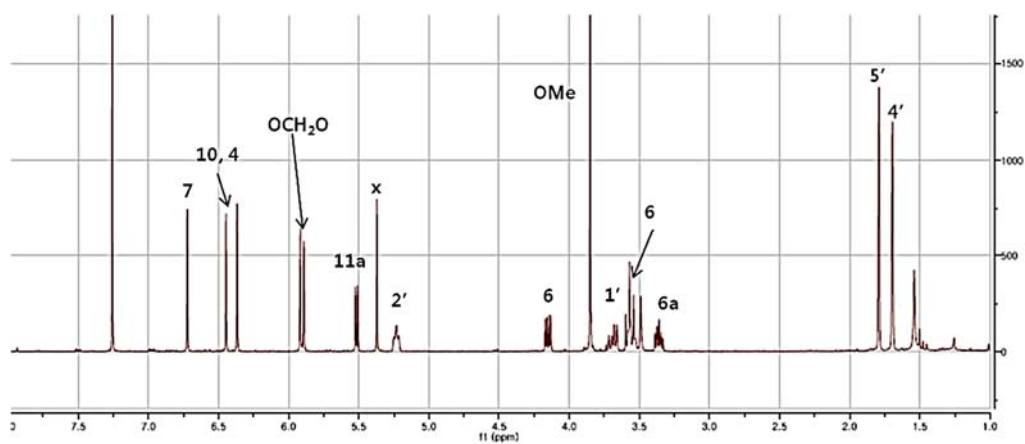


Figure 15. ¹H-NMR spectrum of compound **3** (400 MHz, CD₃OD)

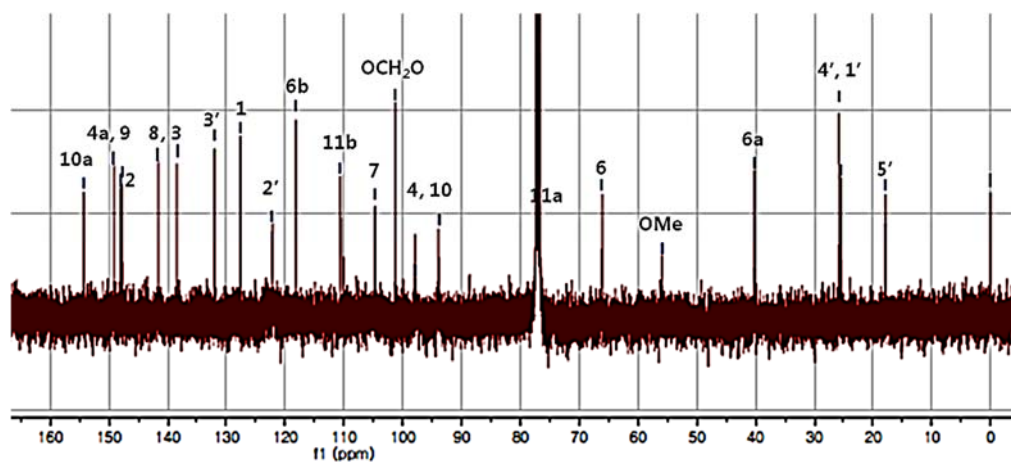


Figure 16. ¹³C-NMR spectrum of compound **3** (100 MHz, CD₃OD)

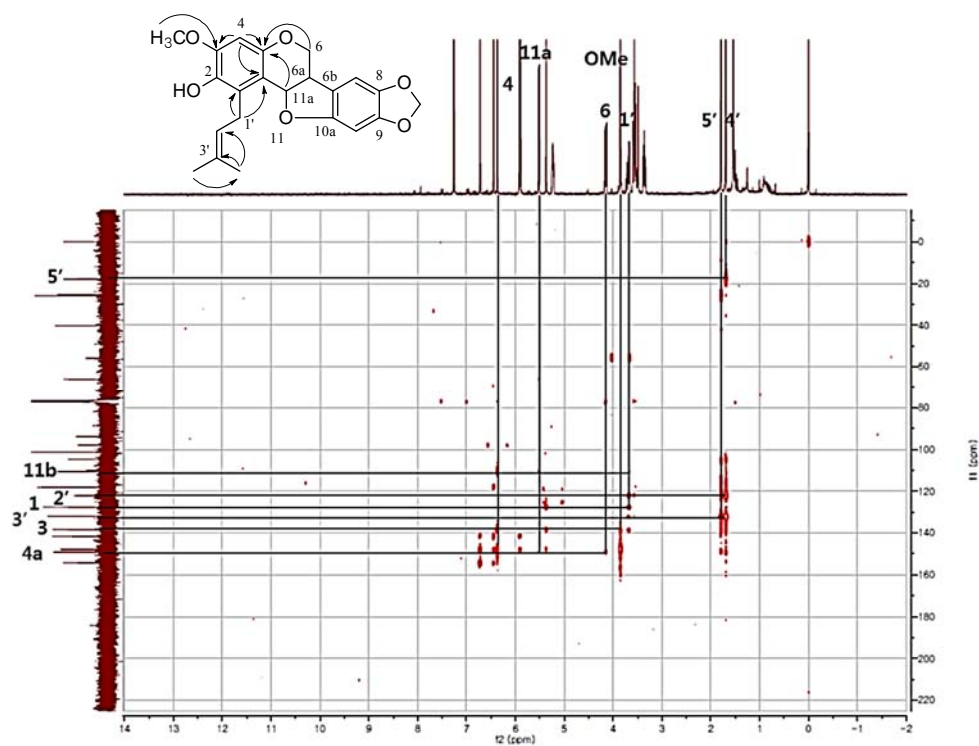


Figure 17. HMBC spectrum of compound **3**

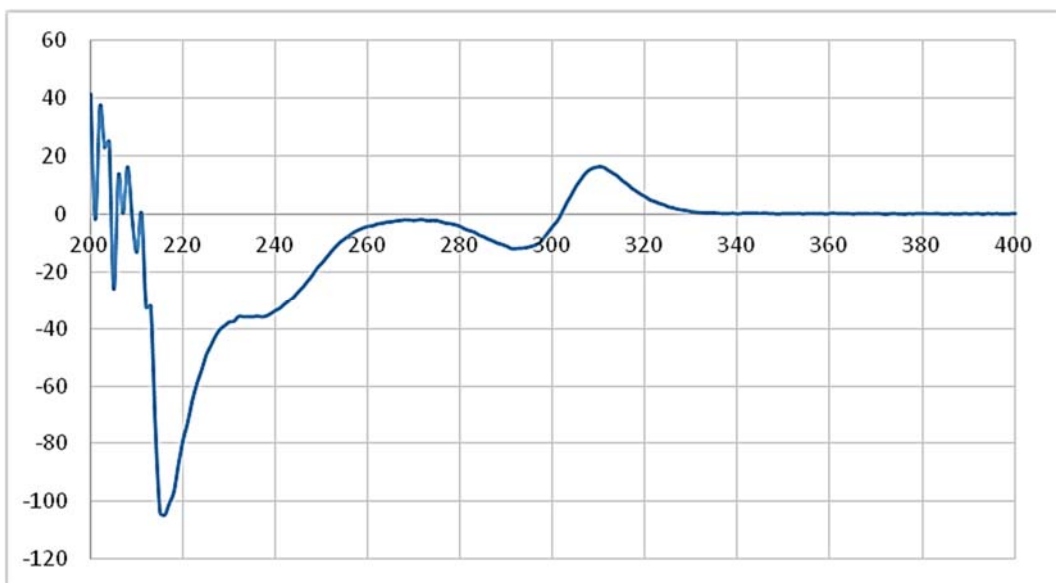


Figure 18. CD spectrum of compound **3**

1.6. 화합물 4의 구조

화합물 4는 노란 침상형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 461.2696 $[M+H]^+$ (calcd: 461.2692; error ppm: 0.9)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{30}H_{36}O_4$ (m.w. 460)로 추정하였다. 1H -NMR data를 통해 화합물 4는 δ_H 3.00 (1H, dd, $J = 15.2, 13.2$ Hz, H-3a), 2.80 (1H, brd, $J = 15.2$ Hz, H-3b), 5.33 (1H, m, H-2)의 signal에서 flavanone의 특징적인 signal을 확인할 수 있었다. δ_H 1.78 (12H, $CH_3 \times 4$), 1.75 (3H, s), 1.74 (3H, s), 5.33 (2H, m, H-2'', H-2'''), 5.26 (1H, t, $J = 6.4$ Hz, H-2''), 3.42 (2H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1''), 3.37 (4H, d, $J = 6.8$ Hz, H-1'', 1''')에서 6개의 methyl group을 포함한 3개의 isoprenyl group의 존재를 확인하였다. 또한 4개의 aromatic proton을 확인할 수 있었는데 δ_H 6.54 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6), 7.75 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5)에서 *ortho*-coupled proton과 δ_H 7.07 (2H, s, H-2', 6')에서 1, 3, 4, 5-사치환 benzene ring 구조로 추정하였다. ^{13}C -NMR spectrum에서 6 개의 methyl group [δ_C 18.3 (C-5'', 5''', 5'''), 14.0 (C-4'', 4''', 4''')]을 포함하여 총 30 개의 carbon signal을 확인할 수 있었다. δ_C 130.8 (C-1'), 126.8 (C-3', 5'), 123.4 (C-5, 2', 6')에서 aromatic carbon을 확인하였고 δ_C 157.4 (C-7), 156.9 (C-9), 149.0 (C-4')에서 oxygenated olefin quaternary carbon과 downfield 영역의 δ_C 187.9 (C-4)에서 ketone에 해당하는 signal을 확인하였다. 이상의 결과를 참고문헌 (Komatsu et al., 1970; Li et al., 2008a)과 비교하여 이 화합물을 sophoranone으로 동정하였다.

1.7. 화합물 5의 구조

화합물 5는 노란 무정형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 393.2064 $[M+H]^+$ (calcd: 393.3066; error ppm: - 0.5)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{25}H_{28}O_4$ (m.w. 392)로 추정하였다. 1H -NMR data를 통해 화합물 5는 δ_H 2.99 (1H, dd, J = 16.9, 12.6 Hz, H-3a), 2.71 (1H, dd, J = 16.9, 3.1 Hz, H-3b), 5.33 (1H, overlapped, H-2)의 signal에서 flavanone의 특징적인 signal을 확인할 수 있었다. δ_H 1.73 (3H, s, H-4'''), 1.70 (3H, s, H-5''') 1.62 (3H, s, H-4''), 1.59 (3H, s, H-5'')에서 4 개의 methyl group을 포함한 2개의 isoprenyl group 의 존재를 확인하였다. δ_H 6.50 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-6), 7.58 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-5)에서 *ortho*-coupled proton과 δ_H 7.19 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-2'), 6.77 (1H, d, J = 8.3 Hz, H-5'), 7.12 (1H, dd, J = 8.3, 2.2 Hz, H-6')에서 1, 3, 4-삼치환 benzene ring 구조로 추정하였다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ_C 18.2 (C-5'', C-5'''), 26.2 (C-4'', C-4''') 4개의 methyl group을 포함하여 총 25개의 carbon signal을 확인할 수 있었다. δ_C 131.7 (C-1'), 129.6 (C-2'), 129.0 (C-3'), 156.6 (C-4'), 115.8 (C-5'), 126.1 (C-6'), 126.9 (C-5), 110.9 (C-6)에서 aromatic carbon을 확인하였고, δ_C 164.2 (C-7), 156.6 (C-4')에서 oxygenated olefin quaternary carbon을, downfield 영역의 δ_C 194.4 (C-4)에서 ketone에 해당하는 signal을 확인하였다. 1H , ^{13}C -NMR spectrum data로 부터, 화합물 5는 화합물 4의 구조에서 isoprenyl group 1개가 떨어져 나간 구조로 추정하였다. 이상의 결과를 참고문헌 (Cho et al., 2012; Lo et al., 2002; Kitagawa et al., 1994; Saitoh et al., 1976)과 비교하여 이 화합물을 glabrol로 동정하였다.

1.8. 화합물 6의 구조

화합물 6은 노란색 무정형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 407.1852 $[M+H]^+$ (calcd: 407.1858; error ppm: - 1.5)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{25}H_{26}O_5$ (m.w. 406)로 추정하였다. 1H -NMR spectrum의 downfield 영역에서 관측된 δ_H 5.64 (1H, br. d, $J = 12.0$ Hz, H-2) 및 2.98 (1H, dd, $J = 16.7, 13.2$, H-3a), 2.74 (1H, brd, $J = 16.7$ Hz, H-3b) signal로부터 flavanone 골격의 H-2, H-3a, 3b를 확인할 수 있었다. δ_H 1.43 (3H, s, H-4''), 1.45 (3H, s, H-5''), 5.70 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-2''), 6.37 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1'') proton signal로부터 *gem*-dimethylchromene ring의 존재를 확인할 수 있었다. Isoprenyl group의 존재는 δ_H 5.17 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-2'''), 1.67 (3H, s, H-4'''), 1.64 (3H, s, H-5''') proton signal로부터 추정할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ_C 194.8 (C-4)의 ketone group (C=O)을 확인하였고, 이와 함께 δ_C 78.9 (C-2), 44.1 (C-3) carbon signal로부터 flavanone 골격으로 확정할 수 있었다. *gem*-Dimethylchromene ring의 methyl group을 δ_C 22.9, 18.2에서 확인하였고, 아울러 oxygenated olefin quaternary carbon signal (δ_C 163.2, 159.7, 158.8, 156.8) 4개를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Ma et al., 1995; Kyogoku et al., 1973)과 비교하여 이 화합물을 2-(2',4'-dihydroxyphenyl)-8,8-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-8*H*-pyrano[2,3-*d*] chroman-4-one으로 동정하였다.

1.9. 화합물 7의 구조

화합물 7은 무색의 무정형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 409.2014 $[M+H]^+$ (calcd: 409.2015; error ppm: - 0.2)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{25}H_{28}O_5$ (m.w. 408)로 추정하였다. 1H -NMR data를 통해 화합물 7은 δ_H 2.92 (1H, dd, J = 16.8, 12.8 Hz, H-3a), 2.71 (1H, dd, J = 16.8, 3.2 Hz, H-3b), 5.59 (1H, dd, J = 12.8, 2.8 Hz, H-2)에서 flavanone의 특징적인 signal을 확인할 수 있었다. δ_H 7.28 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6'), 6.33 (1H, dd, J = 8.8, 2.4 Hz, H-5'), 6.32 (1H, J = 2.4 Hz, H-3')에서 1, 2, 4-삼치환 benzene ring의 존재를 추정할 수 있었다. δ_H 1.78 (3H, s, H-4''), 1.71 (3H, s, H-5''), 1.64 (3H, s, H-4'''), 1.63 (3H, s, H-5''')에서 4개의 methyl group 및 δ_H 5.32 (1H, t, J = 6.8 Hz, H-2''), 5.17 (1H, t, J = 7.4 Hz, H-2'''), 3.35 (1H, brd, J = 6.4 Hz, H-1''), 3.26 (1H, brd, J = 7.2 Hz, H-1''') proton signal로부터 2개의 isoprenyl group 을 확인하였고, δ_H 7.47 (1H, s, H-5)에서 singlet aromatic proton을 확인할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ_C 16.6 (C-5''), 16.4 (C-5'''), 24.6 (C-4'', C-4''')에서 4개의 methyl group을 포함하여 δ_C 127.2 (C-1'), 125.5 (C-2'), 124.1 (C-5)에서 aromatic carbon을, δ_C 160.5 (C-7), 160.1 (C-9), 158.1 (C-6') 155.2 (C-4')에서 oxygenated olefin quaternary carbon을, δ_C 193.8 (C-4)에서 ketone에 해당하는 signal을 확인하였다. 1H , ^{13}C -NMR spectrum data로부터 화합물 7은 화합물 1의 구조에서 5'번 위치에 결합한 isoprenyl group 1개가 A환의 6번 위치로 이동한 구조로 추정하였다. 이상의 결과를 참고문헌 (Kyogoku et al., 1973)과 비교하여 이 화합물을 6,8-diprenyl-7,2',4'-trihydroxyflavanone 으로 동정하였다.

1.10. 화합물 8의 구조

화합물 8은 노란색 무정형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 461.2684 $[M+H]^+$ (calcd: 461.2692; error ppm: - 1.7)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{30}H_{36}O_4$ (m.w. 460)로 추정하였다. 1H -NMR spectrum에서 δ_H 5.31 (1H, dd, $J = 13.1, 2.4$ Hz, H-2), 3.01 (1H, dd, $J = 16.8, 13.3$ Hz, H-3a), 2.67-2.74 (1H, overlapped, H-3b) proton signals에서 flavanone 골격을 가짐을 알 수 있었다. 1H -NMR spectrum의 downfield 영역에서 관측된 δ_H 7.61 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5), 6.50 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-6) proton signal로부터 *ortho*-coupled aromatic ring을 확인하였다. δ_H 7.09 (2H, s, H-2', H-6')로부터 *meta*-coupled aromatic ring이 존재하고 있음을 확인할 수 있었다. Upfield 영역의 δ_H 2.67-2.74 (4H, overlapped, H-1'', H-1'''), 1.73-1.77 (4H, overlapped, H-2'', H-2'''), 1.26 (12H, s, H-4'', H-4''', H-5'', H-5'''), 3.29 (2H, overlapped, H-1'''), 5.21 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2'''), 1.63 (3H, s, H-4'''), 1.60 (3H, s, H-5''') proton signal에서 2개의 2,2-dimethylpyran ring 구조를 추정하였다. 또한 δ_H 1.63 (3H, s, H-4'''), 1.60 (3H, s, H-5'''), 3.29 (2H, overlapped, H-1'''), 5.21 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-2''')에서 isoprenyl group로부터 기인한 proton signal을 확인할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ_C 192.9 (C-4)의 ketone group (C=O) signal과 함께 δ_C 81.3 (C-2), 45.2 (C-3) carbon signal로부터 flavanone 골격으로 확정하였고, δ_C 161.5 (C-7), 152.4 (C-4')에서 oxygenated olefin quaternary carbon signal 2개를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Li et al., 2008a)과 비교하여 이 화합물을 tonkinochromane A으로 동정하였다.

1.11. 화합물 9의 구조

화합물 9는 무색의 무정형 분말로써 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 285.0760 $[M+H]^+$ (calcd: 285.0763; error ppm: -1.1)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{16}H_{12}O_5$ (m.w. 284)로 추정하였다. 1H -NMR data에서 화합물 9는 downfield 영역에서 관측된 3개의 δ_H 7.26 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-1), 6.48 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 6.29 (1H, brd, H-4) proton signal로부터 1, 2, 4-삼치환된 aromatic ring과, 2 개의 δ_H 6.79 (1H, s, H-7), 6.37 (1H, s, H-10) proton signal로부터 1, 2, 4, 5-사치환된 aromatic ring을 가지는 구조임을 알 수 있었다. δ_H 5.86 (2H, d, $J = 10.4$ Hz, $-OCH_2O-$), 5.44 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-11a), 4.21 (1H, dd, $J = 10.4, 4.6$ Hz, H-6), 3.55 (1H, t, $J = 10.4$ Hz, H-6), 3.46 (1H, m, H-6a) proton signal로부터, 화합물 9는 methylenedioxy group이 결합한 pterocarpan 골격을 가지는 것으로 추정하였다. ^{13}C -NMR spectrum downfield 영역에서 δ_C 158.7 (C-3), 156.6 (C-4a), 153.1 (C-10a), 148.0 (C-9), 141.7 (C-8)의 oxygenated olefin quaternary carbon signal, δ_C 118.4 (C-6b), 111.4 (C-1a)의 quaternary carbon signal, δ_C 131.7 (C-1), 109.3 (C-2), 104.5 (C-7), 102.6 (C-4), 92.8 (C-10)의 aromatic methine carbon signal을 확인하였다. 또한, δ_C 101.1 ($-OCH_2O-$)의 methylenedioxy carbon signal, δ_C 78.6 (C-11a)의 oxygenated carbon signal, δ_C 66.0 (C-6)의 oxygenated carbon signal, δ_C 40.1 (C-6a)의 methine carbon signal을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (박정안, 2002)과 비교하여 이 화합물을 methylenedioxy group이 결합한 pterocarpan 계열의 maackiain으로 동정하였다.

1.12. 화합물 **10**의 구조

화합물 **10**은 무색의 무정형 분말로써 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 271.0970 $[M+H]^+$ (calcd: 271.0970; error ppm: 0)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{16}H_{14}O_4$ (m.w. 270)로 추정하였다. 1H -NMR data에서 화합물 **10**은 downfield 영역에서 관측된 δ_H 7.29 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-7), 7.17 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-1), 6.49 (1H, dd, J = 8.4, 2.4 Hz, H-8), 6.44 (1H, dd, J = 8.4, 2.4 Hz, H-2), 6.38 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-4), 6.30 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-10) proton signal로부터 2개의 1, 2, 4-삼치환 aromatic ring을 가지는 구조임을 알 수 있었다. δ_H 5.47 (1H, d, J = 5.6 Hz, H-11a), 4.22 (1H, dd, J = 16.4, 10.4 Hz, H-6), 3.74 (3H, s, $-OCH_3$), 3.51-3.56 (2H, m, H-6, H-6a) proton signal로부터, 화합물 **10**은 methoxy group이 결합한 pterocarpan 골격을 가지는 것으로 추정하였다. ^{13}C -NMR spectrum downfield 영역에서 δ_C 161.2 (C-9), 160.6 (C-10a), 158.7 (C-3), 156.6 (C-4a)의 oxygenated olefin quaternary carbon signal, δ_C 119.4 (C-6b), 111.4 (C-11b)의 olefin quaternary carbon signal, δ_C 131.7 (C-1), 124.5 (C-7), 109.3 (C-2), 105.8 (C-8), 102.6 (C-4), 96.1 (C-10)의 methine carbon signal을 확인하였다. 산소가 치환된 영역에서 δ_C 78.7 (C-11a)의 carbon signal, δ_C 66.1 (C-6)의 oxygenated methylene carbon signal, δ_C 54.5 ($-OCH_3$)의 methoxy carbon signal, δ_C 39.5 (C-6a)의 methine carbon signal을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Choi et al., 2009)과 비교하여 화합물 **10**을 pterocarpan 계열의 medicarpin으로 동정 하였다.

1.13. 화합물 **11**의 구조

화합물 **11**은 무색의 무정형 분말로써 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 489.1403 $[M+H]^+$ (calcd: 489.1397; error ppm: 1.2)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{24}H_{24}O_{11}$ (m.w. 488)로 추정하였다. 1H -NMR data에서 화합물 **11**은 downfield 영역에서 관측된 3 개의 δ_H 7.37 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-1), 6.75 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-2), 6.62 (1H, brs, H-4) proton signal로부터 1, 2, 4-삼치환 aromatic ring과, 2개의 δ_H 6.80 (1H, s, H-7), 6.37 (1H, s, H-10) proton signal로부터 1, 2, 4, 5-사치환 aromatic ring을 가지는 구조임을 알 수 있었다. δ_H 5.87 (2H, J = 15.6 Hz, -OCH₂O-), 5.48 (1H, d, J = 6.4 Hz, H-11a), 4.24 (1H, m, H-6), 3.67-3.34 (1H, m, H-6a) proton signal로부터, 화합물 **11**은 methylenedioxy group이 결합한 pterocarpan 골격을 가지는 것으로 추정할 수 있었다. 뿐만 아니라 1개의 anomeric proton signal δ_H 4.88 (1H, overlapped, H-1'), 4개의 oxygenated methine proton signal δ_H 3.67-3.34 (4H, m, H-2', 3', 4', 5') 및 1개의 oxygenated methylene proton signal δ_H 4.39 (1H, d, J = 11.6, H-6'a), 4.24 (1H, m, H-6'b)를 관측하였다. Upfield 영역에서 1 개의 methyl proton signal δ_H 2.03 (3H, s, -COCH₃)로부터 downfield shift되어 관측되는 carbonyl에 결합한 methyl기를 예상할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum downfield 영역에서 δ_C 172.8 (-COCH₃)의 carbonyl carbon signal, δ_C 160.1 (C-3), 157.9 (C-4a), 155.6 (C-10a), 149.6 (C-9), 143.2 (C-8)의 oxygenated olefin quaternary carbon signal, δ_C 119.6 (C-6b), 116.0 (C-11b)의 quaternary carbon signal, δ_C 133.0 (C-1), 111.9 (C-2), 106.0 (C-7), 105.7 (C-4), 94.3 (C-10)의 methine carbon signal을 확인하였다. 산소가 치환된 영역에서 δ_C 79.7 (C-11a)의 oxygenated methine carbon signal, δ_C 67.5 (C-6)의 oxygenated methylene carbon signal, δ_C 41.6 (C-6a)

의 methine carbon signal을 확인할 수 있었다. Upfield 영역에서 δ_C 20.7 (-COCH₃)의 acetyl기에서 유래한 methyl carbon signal을 확인하였다. 또한 당에서부터 유래한 δ_C 101.9 (C-1'), 77.9 (C-5'), 75.4 (C-3'), 74.8 (C-2'), 71.7 (C-4'), 64.7 (C-6') signal이 관측되었고, 당의 chemical shift 값으로부터 glucopyranose임을 알 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Stevenson et al., 1996) 과 비교하여 화합물 **11**은 pterocarpan 계열의 maackiain (화합물 **9**) 이 aglycone으로 존재하고, 3 번 위치에 acetyl glucopyranose가 결합한 maackiain-3-*O*-glucoside-6"-acetate로 동정하였다.

1.14. 화합물 **12**의 구조

화합물 **12**는 무색의 무정형 분말로써 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 475.1589 $[M+H]^+$ (calcd: 475.1604; error ppm: -3.2)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{24}H_{26}O_{10}$ (m.w. 474)로 추정하였다. 1H -NMR data에서 화합물 **12**는 downfield 영역에서 관측된 δ_H 7.40 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-1), 7.17 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-7), 6.77 (1H, dd, J = 8.4, 2.4 Hz, H-2), 6.63 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-4), 6.45 (1H, dd, J = 8.4, 2.0 Hz, H-8), 6.38 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-10) proton signal로부터 2개의 1, 2, 4-삼치환 aromatic ring을 가지는 구조임을 알 수 있었다. δ_H 5.51 (1H, d, J = 5.6 Hz, H-11a), 4.24 (1H, m, H-6), 3.74 (3H, s, -OCH₃), 3.67-3.34 (1H, m, H-6) proton signal로부터, 화합물 **12**는 methoxy group이 결합한 pterocarpan 골격을 가지는 것으로 추정하였다. 또한 1개의 anomeric proton signal δ_H 4.89 (1H, overlapped, H-1'), 4개의 oxygenated methine proton signal δ_H 3.67-3.34 (4H, m, H-2', 3', 4', 5') 및 1개의 oxygenated methylene proton signal δ_H 4.39 (1H, d, J = 12.0, H-6'a), 4.24 (1H, m, H-6'b)를 관측할 수 있었는데 이로부터 화합물 **11**과 당종류 및 치환 형태가 동일함을 유추할 수 있었다. Upfield 영역에서 1개의 methyl proton signal δ_H 2.02 (3H, s, -COCH₃)로부터 carbonyl에 결합한 methyl기를 예상할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Yoon et al., 2004; Stevenson et al., 1996) 과 비교하여 이 화합물을 pterocarpan 계열의 medicarpin (화합물 **10**)이 aglycone으로 존재하고, 3번 위치에 acetyl glucopyranose가 결합한 medicarpin-3-*O*-glucoside-6"-acetate으로 동정하였다.

1.15. 화합물 **13**의 구조

화합물 **13**은 무색의 분말로써 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 299.0918 $[M+H]^+$ (calcd: 299.0919; error ppm: -0.3)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{17}H_{14}O_5$ (m.w. 298)로 추정하였다. 1H -NMR data에서 화합물 **13**은 downfield 영역에서 관측된 3 개의 δ_H 7.40 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-1), 6.63 (1H, dd, $J = 8.8, 2.8$ Hz, H-2), 6.47 (1H, d, 2.4 Hz, H-4) proton signal로부터 1, 2, 4-삼치환된 aromatic ring과, 2개의 δ_H 6.72 (1H, s, H-7), 6.43 (1H, s, H-10) proton signal로부터 1, 2, 4, 5-사치환된 aromatic ring을 가지는 구조임을 알 수 있었다. δ_H 5.90 (2H, d, $J = 10.8$ Hz, -OCH₂O-), 5.48 (1H, d, $J = 6.8$ Hz, H-11a), 4.23 (1H, dd, $J = 10.8, 4.8$ Hz, H-6), 3.79 (3H, s, -OCH₃), 3.66 (1H, t, $J = 11.2$ Hz, H-6), 3.48 (1H, m, H-6a) proton signal로부터 화합물 **13**은 methylenedioxy group이 결합한 pterocarpan 골격을 가지는 것으로 추정하였다. ^{13}C -NMR spectrum의 downfield 영역에서 δ_C 161.1 (C-3), 156.6 (C-4a), 154.3 (C-10a), 148.1 (C-9), 141.7 (C-8)의 oxygenated olefin quaternary carbon signal, δ_C 118.0 (C-6b), 112.4 (C-1a)의 quaternary carbon signal, δ_C 109.1 (C-2), 109.1 (C-7), 104.8 (C-4), 66.5 (C-10)의 methine carbon signal을 확인하였다. 또한, δ_C 101.7 (-OCH₂O-)의 methylenedioxy carbon signal, δ_C 78.6 (C-11a)의 oxygenated methine carbon signal, δ_C 66.5 (C-6)의 oxygenated methylene carbon signal, δ_C 40.3 (C-6a)의 methine carbon signal을 확인할 수 있었다. δ_C 55.4 (-OCH₃)에서 methoxy group를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Miki et al., 1998)과 비교하여 이 화합물을 maackiain (화합물 **9**)의 3번 위치에 methoxy group이 치환된 pterocarpin으로 동정하였다.

1.16. 화합물 **14**의 구조

화합물 **14**는 백색 결정의 분말로써 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 447.1270 $[M+H]^+$ (calcd: 447.1291; error ppm: -4.7)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{22}H_{22}O_{10}$ (m.w. 446)로 추정하였다. 1H -NMR data에서 화합물 **14**는 downfield 영역에서 관측된 δ_H 7.37 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-1), 6.71 (1H, brd, J = 8.8 Hz, H-2), 6.56 (1H, brs, H-4) proton signal로부터 1, 2, 4-삼치환 aromatic ring과, 2 개의 δ_H 6.99 (1H, s, H-7), 6.54 (1H, s, H-10) proton signal로부터 1, 2, 4, 5-사치환 aromatic ring을 가지는 구조임을 알 수 있었다. δ_H 5.93 (2H, d, J = 15.6 Hz, $-OCH_2O-$), 5.57 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-11a), 4.28 (1H, dd, J = 7.0, 4.0 Hz, H-6), 3.70-3.14 (1H, m, H-6), 3.44 (1H, m, H-6a) proton signal로부터, 화합물 **14**는 methylenedioxy group이 결합한 pterocarpan 골격을 가지는 것으로 추정하였다. 뿐만 아니라, 1개의 anomeric proton signal δ_H 4.58 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1')과 δ_H 3.70-3.14 (5H, m, H-2', 3', 4', 5', 6') proton signal로부터 glucopyranose의 존재를 관측하였다. ^{13}C -NMR spectrum의 downfield 영역에서 δ_C 158.9 (C-3), 156.6 (C-4a), 154.1 (C-10a), 147.9 (C-9), 141.6 (C-8)의 oxygenated olefin quaternary carbon signal, δ_C 118.7 (C-6b), 114.6 (C-11b)의 quaternary carbon signal, δ_C 132.3 (C-1), 110.8 (C-2), 105.8 (C-7), 104.4 (C-4), 93.7 (C-10)의 methine carbon signal을 확인하였다. 또한, δ_C 101.5 ($-OCH_2O-$)의 methylenedioxy carbon signal, δ_C 78.1 (C-11a)의 oxygenated methine carbon signal, δ_C 66.3 (C-6)의 oxygenated methylene carbon signal, δ_C 40.5 (C-6a)의 methine carbon signal을 확인할 수 있었다. 또한 당에서부터 유래한 δ_C 100.7 (C-1'), 77.5 (C-5'), 76.9 (C-3'), 73.6 (C-2'), 70.1 (C-4'), 61.1 (C-6') signal이 관측되었고, 당의 chemical shift 값으로부터 glucopyranose임을 알

수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (박정안, 2002)과 비교하여 이 화합물은 pterocarpan 계열의 maackiain (화합물 9)이 aglycone으로 존재하고, 3번 위치에 glucopyranose가 치환된 trifolirhizin으로 동정하였다.

1.17. 화합물 15의 구조

화합물 15는 노란색 무정형 분말의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 459.2525 $[M+H]^+$ (calcd: 459.2535; error ppm: -2.2)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{30}H_{34}O_4$ (m.w. 458)로 추정하였다. 1H -NMR spectrum의 downfield 영역에서 관측된 δ_H 7.74 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.53 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6) proton signal로부터 *ortho*-coupled aromatic ring과 δ_H 7.04 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6'), 6.92 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2') proton signal로부터 2 개의 *meta*-coupled aromatic ring이 존재하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 δ_H 5.31 (2H, m), 3.43 (4H, m), 1.73 (12H, m, $CH_3 \times 4$)에서 2 개의 isoprenyl group으로부터 기인한 proton signal을 확인할 수 있었다. Upfield 영역에서 δ_H 1.43 (6H, $CH_3 \times 2$) methyl proton signal을 확인할 수 있었다. δ_H 5.32 (1H, dd, $J = 13.2, 2.8$ Hz, H-2), 3.02 (1H, dd, $J = 12.6, 13.2$ Hz, H-3b), 2.75 (1H, dd, $J = 16.8, 2.8$ Hz, H-3a) proton signal과 δ_C 191.8 (C-4), 110.4 (C-2), 45.9 (C-3) carbon signal로부터 flavanone 골격을 가짐을 알 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ_C 191.8 (C-4)의 ketone group ($C=O$)을 확인하였으며, 이와 함께 *gem*-dimethylpyran moiety δ_C 44.0 (C-1'''), 28.2 (C-5'''), 28.1 (C-4'''), 25.8 (C-5'''), 17.6 (C-4''')가 결합하고 있음을 알 수 있었다. 또한 δ_C 161.3 (C-7), 160.9 (C-9), 150.7 (C-4')에서 3 개의 oxygenated olefin quaternary carbon signal을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Li et al., 2008a)과 비교하여 이 화합물을 sophoranochromene으로 동정하였다.

1.18. 화합물 **16**의 구조

화합물 **16**은 노란색 무정형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 257.0815 $[M+H]^+$ (calcd: 257.0814; error ppm: 0.4)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 $C_{15}H_{12}O_4$ (m.w. 256.25)로 추정하였다. 1H -NMR spectrum에서 proton signal δ_H 7.97 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6'), 7.79 (1H, d, J = 15.2 Hz, H- β), 7.62 (1H, d, J = 15.2 Hz, H- α), 7.62 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.84 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5), 6.41 (1H, dd, J = 8.8, 2.4 Hz, H-5'), 6.28 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-3') 이 관측되어 *para*-이치환 aromatic ring, 1, 2, 4-삼치환 aromatic ring 및 *trans* 구조를 갖는 이중결합의 존재가 예측되었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 *para*-이치환 aromatic ring의 존재를 예상 할 수 있는 δ_C 117.0 (C-3, 5), 131.9 (C-2, 6) carbon signal을 검출하여, 총 15개의 carbon을 갖는 구조임을 추정하였다. δ_C 193.5에서 ketone signal이 관측되었고, δ_C 167.6 (C-4'), 166.8 (C-2'), 161.6 (C-4)에서 3개의 oxygenated olefin quaternary carbon signal이 관측되었다. δ_C 114.6 (C-1'), 127.9 (C-1)에서 2개의 quaternary carbon signal이, δ_C 145.6 (C- β), 133.4 (C-6'), 131.9 (C-2, C-6), 118.4 (C- α), 116.9 (C-3, C-5), 109.3 (C-5'), 103.8 (C-3')에서는 9개의 methine carbon signal이 관측되었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Ma et al., 2005)과 비교하여 화합물 **16**은 chalcone 골격에 3개의 hydroxy group을 가진 화합물인 isoliquiritigenin으로 동정하였다.

1.19. 화합물 17의 구조

화합물 17은 백색의 무정형 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 367.1178 $[M+H]^+$ (calcd: 367.1178; error ppm: -0.5)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{21}H_{18}O_6$ (m.w. 366) 로 추정하였다. 1H -NMR data 에서 δ_H 6.74 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-4'), 5.76 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-3'), 1.46 (3H, s, H-6'), 1.48 (3H, s, H-5')를 통해 2,2-dimethylpyran ring을 유추할 수 있으며, δ_H 6.72 (1H, s, H-7), 6.44 (1H, s, H-10), 6.43 (1H, s, H-4) 에서의 3개의 singlet aromatic proton과 δ_H 5.92 (1H, s, -OCH₂O-), 5.89 (1H, s, -OCH₂O-)에서의 methylenedioxy group을 확인하고, δ_H 4.16 (1H, dd, $J = 11.2, 5.2$ Hz, H-6), 3.55 (1H, t, $J = 11.6$ Hz, H-6), 3.40 (1H, m, H-6a), 5.52 (1H, d, $J = 6.4$ Hz, H-11a)에서 본 구조가 pyran ring을 가지고 있는 pterocarpan 골격임을 확인하였다. ^{13}C -NMR spectrum의 δ_C 66.2 (C-6), 40.2 (C-6a)에서 pterocarpan 골격의 특이적인 signal을 재확인 할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Li et al., 2009)과 비교하여 이 화합물을 maackiapterocarpan B 으로 동정하였다.

1.20. 화합물 18의 구조

화합물 18은 노란색 무정형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 269.0816 $[M+H]^+$ (calcd: 26.0814; error ppm: 0.7)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{16}H_{12}O_4$ (m.w. 268)로 추정하였다. 1H -NMR spectrum에서 proton signal δ_H 7.97 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5), 6.93 (1H, dd, J = 2.2, 8.8 Hz, H-6), 6.85 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-8), 7.50 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-2', H-6'), 6.99 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-3', H-5')이 관측되어 *para*-이치환 및 1, 2, 4-삼치환 aromatic ring의 존재가 각각 예측되었다. δ_H 8.33 (1H, s, H-2)에서 isoflavone H-2 유래 proton signal을 확인할 수 있었다. 또한 δ_H 3.79 (3H, s, OCH₃)에서 methoxy group이 존재하고 있음을 알 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 총 14 개의 carbon signal을 확인할 수 있었으나, *para*-이치환 aromatic ring의 존재를 예상 할 수 있는 δ_C 113.6 (C-3', 5'), 130.0 (C-2', 6') carbon signal을 검출하여, 총 16개의 carbon을 갖는 구조임을 추정하였다. 또한 isoflavone 골격의 특징적인 C-2, 3, 4 signal을 δ_C 153.1 (C-2), 174.5 (C-4) 123.1 (C-3)에서 확인하였고, oxygenated methyl carbon을 δ_C 55.2 (OCH₃)에서 확인하였다. 이상의 결과를 참고문헌 (Kinjo et al., 1987)과 비교하여 이 화합물을 formononetin으로 동정하였다.

1.21. 화합물 19의 구조

화합물 19는 노란색 무정형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 271.0607 $[M+H]^+$ (calcd: 271.0606; error ppm: 0.4)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{15}H_{10}O_5$ (m.w. 270)로 추정하였다. 1H -NMR spectrum에서 proton signal δ_H 7.36 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2', 6'), 6.84 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3', 5'), 6.33 (1H, s, H-8), 6.21 (1H, s, H-6)이 관측되어 *para*-이치환 및 1, 2, 3, 5-사치환 aromatic ring의 존재가 각각 예측되었다. δ_H 8.05 (1H, s, H-2)에서 isoflavone H-2 유래의 특징적인 proton signal을 확인할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 총 13 개의 carbon signal을 확인할 수 있었으나 *para*-이치환 aromatic ring의 존재를 예상 할 수 있는 δ_C 116.3 (C-3', 5'), 131.4 (C-2', 6') carbon signal을 검출하여, 총 15개의 carbon을 갖는 구조임을 추정하였다. 또한 isoflavone 골격의 특징적인 C-2, 3, 4 signal을 δ_C 154.8 (C-2), 182.3 (C-4) 124.7 (C-3)에서 확인 할 수 있었다. 이로부터 isoflavone 골격의 C-5, C-7 그리고 C-4' 위치에 각각 hydroxy group이 결합한 구조를 이루고 있음을 추정할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Caligiani et al., 2010; Kinjo et al., 1987)과 비교하여 이 화합물을 genistein으로 동정하였다.

1.22. 화합물 20의 구조

화합물 20은 노란색 무정형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 255.0658 $[M+H]^+$ (calcd: 255.0657; error ppm: 0.4)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{15}H_{12}O_4$ (m.w. 254)로 추정하였다. 1H -NMR downfield에서 δ_H 6.6~8.0 사이에 8 개의 proton에 해당하는 peak만이 나타나 aromatic ring만으로 이루어진 phenolic 화합물임을 예측할 수 있었다. Proton signal δ_H 7.87 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6'), 7.95 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.89 (1H, dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, H-6), 6.92 (1H, overlapped, H-7), 6.93 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5')로 *para*-이치환 및 1, 2, 4-삼치환 aromatic ring의 존재가 각각 예측되었다. 또한 flavone C ring의 3번 proton에서 유래되는 특징적인 δ_H 6.66 (1H, s, H-3) proton signal을 확인할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ_C 178.9 (C-4) carbon signal로부터 flavone 골격의 특징적인 α, β -unsaturated carbonyl group을 검출할 수 있었다. 또한 δ_C 115.6 (C-3', 5') 과 δ_C 127.9 (C-2', 6')에서는 2배의 intensity를 갖는 peak들이 나타나 *para* 위치로 치환된 aromatic ring이 존재함을 알 수 있었다. 이로부터 flavone 골격의 C-7과 C-4' carbon 위치에 각각 hydroxy group이 결합한 구조를 이루고 있음을 추정할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Park et al., 2007)과 비교하여 이 화합물을 7,4'-dihydroxyflavone으로 동정하였다.

1.23. 화합물 **21**의 구조

화합물 **21**은 갈색 무정형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 257.0808 $[M+H]^+$ (calcd: 257.0814; error ppm: -2.3)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{15}H_{12}O_4$ (m.w. 256)로 추정하였다. 1H -NMR과 1H - 1H COSY spectrum으로부터 δ_H 7.75 (1H, d, J = 8.6 Hz, H-6'), 6.52 (1H, dd, J = 8.6, 2.4 Hz, H-5'), 6.48 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-3') 그리고 7.30 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-4), 6.69 (1H, dd, J = 8.4, 2.1 Hz, H-7), 6.88 (1H, d, J = 2.1 Hz, H-5)에서 각각의 correlation을 확인할 수 있었다. δ_H 3.79 (3H, s, -OCH₃)에서 1개의 methoxy group이 존재하고 있음을 확인할 수 있었고, 이는 C-4' (δ_C 159.5) signal과 correlation 하고 있는 것을 HMBC spectrum을 통해 확정할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 1개의 methoxy group [δ_C 53.4 (-OCH₃)]을 포함하여 총 15개의 carbon signal을 확인할 수 있었다. δ_C 159.5 (C-4'), 154.5 (C-2'), 153.9 (C-7a), 153.8 (C-6), 151.0 (C-2)에서 5개의 oxygenated olefin quaternary carbon signal이 관측되었다. 이로부터 arylbenzofuran 골격을 이루고 있음을 추정할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Erasto et al., 2004)과 비교하여 이 화합물을 bolusanthin IV (6,6'-dihydroxy-4'-methoxy-2-arylbenzofuran)으로 동정하였다.

1.24. 화합물 **22**의 구조

화합물 **22**는 갈색 무정형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 271.0606 $[M+H]^+$ (calcd: 271.0606; error ppm: 0)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{15}H_{10}O_5$ (m.w. 270)로 추정하였다. 1H -NMR spectrum 으로부터 δ_H 7.64 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-6'), 6.39 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-5'), 6.36 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-3')에서 각각의 correlation을 확인하여, 1, 2, 4-삼치환 aromatic ring의 존재를 확인할 수 있었다. δ_H 7.05 (1H, s, H-2), 6.99 (1H, s, H-4), 6.91 (1H, s, H-7)에서 coupling하지 않는 3 개의 singlet methine proton signal과 δ_H 5.93 (2H, br.s, $-OCH_2O-$)에서 methylenedioxy proton signal을 확인하여 A환의 C-5, 6 위치에 methylenedioxy group이 결합하고 있음을 추정하였다. ^{13}C -NMR spectrum에서 총 15개의 carbon signal을 확인할 수 있었으며, δ_C 102.4 ($-OCH_2O-$)에서 methylenedioxy methin carbon signal이 확인되었다. 또한 δ_C 154.6 (C-2), 145.7 (C-5), 146.8 (C-6), 150.0 (C-7a), 159.5 (C-2'), 156.9 (C-4')에서 oxygenated olefin quaternary carbon 5개를 확인할 수 있었다. 화합물 **22**는 화합물 **21**과 유사한 골격에 methylenedioxy group이 결합한 구조임을 추정할 수 있었다. 이상의 결과를 참고문헌 (Iinuma et al., 1993)과 비교하여 이 화합물을 2-(2',4'-dihydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxybenzofiran으로 동정하였다.

1.25. 화합물 **23**의 구조

화합물 **23**은 노란색 침상형의 화합물로서 HRESIMS (positive ion mode)에서 m/z 461.2961 $[M+H]^+$ (calcd: 461.2962; error ppm: -0.2)의 분자 이온피크를 보여 이 화합물의 분자식을 $C_{30}H_{36}O_4$ (m.w. 460)로 추정하였다. 1H -NMR spectrum의 downfield 영역에서 관측된 2개의 proton signal δ_H 7.81 (1H, d, J = 15.4 Hz, H- β), 7.42 (1H, d, J = 15.4 Hz, H- α)로부터 *trans*의 이중결합 한 쌍이 존재함을 확인하였다. 2개의 proton signal δ_H 7.29 (2H, s, H-2, 6)로부터 1, 3, 4, 5-사치환 aromatic ring을 확인하였고, δ_H 6.42 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-5'), 7.74 (1H, d, J = 8.9 Hz, H-6')의 doublet signal로 *ortho*-coupled aromatic ring의 존재를 확인하였다. 이로부터 이 화합물의 구조가 C환이 개환된 chalcone 골격을 가지는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 δ_H 1.77-1.84 (18H, m), 5.31 (3H, m, H-2'', 2''', 2'''), 그리고 3.48 (2H, d, J = 6.0 Hz, H-1''), 3.38 (4H, m, H-1'', 1''')에서 3개의 isoprenyl group로부터 기인한 proton signal을 확인할 수 있었다. ^{13}C -NMR spectrum에서 δ_C 192.2의 ketone group (C=O)을 확인하였으며, 이와 함께 δ_C 128.7 (C- α), 144.9 (C- β) carbon signal로부터 chalcone 골격으로 확정할 수 있었다. δ_C 163.9 (C-2'), 161.4 (C-4'), 155.5 (C-4)에서 oxygenated olefin quaternary carbon signal 3개를 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 참고 문헌 (Komatsu et al., 1970)과 비교하여 이 화합물을 sophoradin으로 동정하였다.

2. 분리된 화합물 및 산두근 *n*-BuOH 분획의 항천식 효과

2.1. 분리된 화합물의 IL-6 생성 억제

IL-6는 염증세포에 의해 생성되는 cytokine으로 allergens, 바이러스, 운동 등의 자극에 의해 폐의 상피 세포에서도 생성된다 (Marini et al., 1992; Stadnyk et al., 1994; Yokoyama et al., 1995; Broide et al., 1992). 이러한 IL-6는 기존에 알려진 IL-4, IL-5, IL-13, IL-17에 비해 폐 염증 반응에서의 중요도가 낮게 인식되어 왔다. 하지만 CD4 T 세포 반응 (Dienz et al., 2009), Th2 세포 분화시 IL-4 생성촉진, Th1 세포 분화 억제, Th17 세포 분화 촉진등 면역 반응에서 중요한 역할을 하고 있음이 알려지고 있고 (Rincon et al., 2012) 천식환자의 혈청에서 IL-6가 증가되어 있다고 보고되어 있어 (Yokoyama et al., 1995) 최근 이의 조절 여부가 중요하게 인식되고 있다. 이에 산두근 *n*-BuOH 층에서 분리한 화합물에 대해 IL-6 억제활성을 측정하고자 하였다. 20 μ M, 4 μ M의 두 농도에서 50% 이상의 억제율을 보인 성분을 선정해 IC₅₀를 구하기 위한 실험을 진행하였다. 시험결과 화합물 **1, 5, 9, 21**는 IL-6 생성을 IC₅₀ 1.62, 0.73, 3.01, 4.02 μ M 수준에서 억제하였다 (Table 2). 이상의 결과로부터 구조-활성간의 명확한 상관관계를 밝힐 수는 없었지만 분리한 isoprenylated flavanone들 중 치환 형태에 따라 억제 효과가 달라질 수 있음은 일부 확인할 수 있었다. A-ring의 6번 위치에 isoprenyl group이 치환되어 있는 화합물 **7**과 B-ring의 3' 위치에 isoprenyl group이 치환되어 있는 화합물 **4**는 효과가 미약하였다. 따라서 두 위치에는 치환기가 없어야 효과가 증가함을 알 수 있었다. 또한 pterocarpan 골격을 갖는 화합물 **2, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17** 중에는 화합물 **9**

(maackiain)가 가장 우수한 억제활성을 보였는데 pterocarpan 골격의 1번과 2번 위치에 치환기가 없고 3번 위치의 hydroxyl기가, 8번과 9번 위치에 methylenedioxy기가 치환된 형태가 가장 우수한 활성을 보임을 알 수 있었다 (Figure 19).

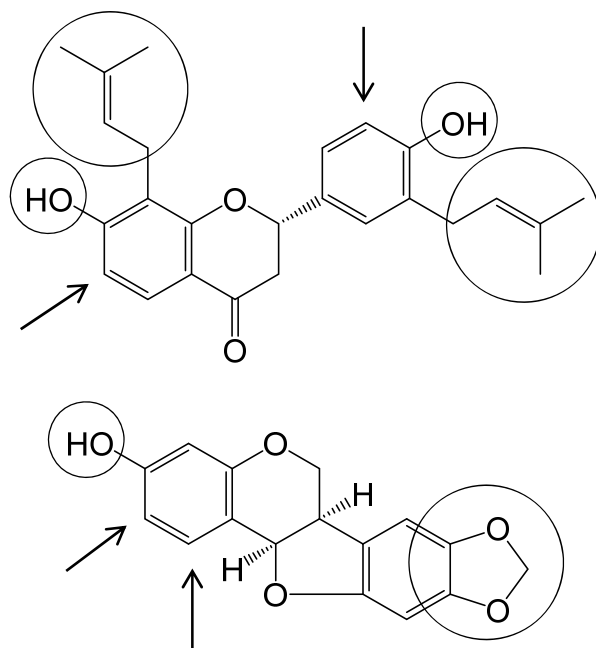


Figure 19. The key structure of isoprenylated flavanone and pterocarpan on the inhibition of IL-6 production

Table 2. Inhibition of IL-6 production of compounds from *S. tonkinensis*

Compound No.	IC ₅₀ (μM)
1	1.62
2 – 4	> 20 μM
5	0.73
6 – 8	> 20 μM
9	3.01
10 – 20	> 20 μM
21	4.02
22 – 23	> 20 μM

2.2. 분리된 화합물의 기도염증 억제

Trifolirhizin (화합물 14)은 maackain (화합물 9)의 3번 hydroxyl기에 glucose가 결합되어 있는 maackain 골격의 화합물로서 기도 평활근의 수축을 억제할 뿐만 아니라 수축된 기도평활근을 이완시키는 작용이 있음이 최근 보고되었다 (Yang et al., 2013). 또한 Maackiain은 마우스 T 세포의 mixed lymphocyte reaction (MLR)을 억제한다고 보고되고 있고 (Kim et al., 2013) sophoranone (화합물 4)의 경우 뛰어난 ROS (reactive oxygen species) 억제 작용이 있음이 보고되고 있다 (Atta-ur-Rahman et al., 2012). 이에 산두근 *n*-BuOH 층에 다량 함유된 성분인 trifolirhizin, maackiain, sophoranone에 대해 천식 염증에 미치는 영향을 평가하고자 대표적인 기관지 염증 모델인 *in vivo* murine asthma 모델을 사용해 약효를 측정하였다 (Figure 20). Saline 투여군과 비교시 OVA/0.5% CMC 투여군에서 기관지세척액 (BALF) 내 총 leukocyte는 약 4.4배가 증가하였고 이중 염증세포의 약 65%는 호산구 (eosinophil)였다. 반면 saline group에서는 호산구가 발견되지 않아 유발이 잘 되었음을 알 수 있었다. 양성 대조군으로 사용한 rolipram은 통계적으로 유의하게 강한 억제 활성을 보였는데 시험물질 중에는 maackiain 투여군 만이 통계적으로 유의한 억제효과를 보였다. Trifolirhizin은 22.6%의 호산구 증가 억제율을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다 ($p = 0.081$). Sophoranone의 경우 용해도 문제로 30% PEG에 분산시켜 투여하였다 (Figure 21). 30% PEG 투여군은 0.5% CMC군과 비교했을 때 총 leukocytes는 77.8%, 호산구는 71% 수준으로 유발되었다. Sophoranone 투여군은 통계적으로 유의한 억제 효과가 없었는데 이는 sophoranone의 낮은 흡수율 및 빠른 소실속도에 기인할 수 있다 (Yoo et al., 2014).

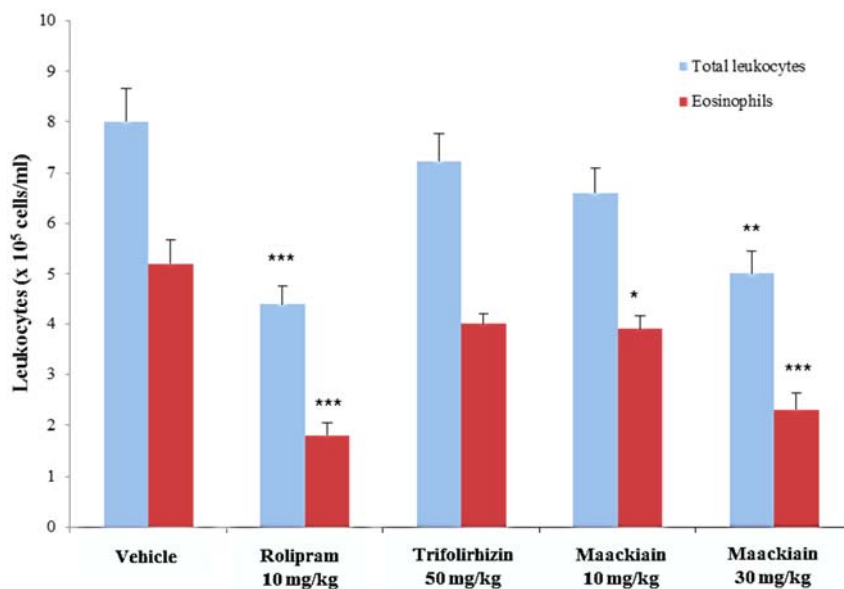


Figure 20. Effects of compound **14** (trifolirhizin) and compound **9** (maackiain) on the infiltration of inflammatory cells in BALF. Female BALB/c mouse was challenged with 1% OVA inhalation (at day 22, 24) to induce allergic inflammation after sensitization with 50 μ g OVA and 500 μ g alum (at day 0, 7, 14). BALF was obtained from each group 1 day after last challenge, and the number of total leukocytes and eosinophils were determined. Animals were orally administered with 0.5% CMC or compounds (at day 22 ~ 24; suspended in 0.5% CMC). Results are shown as mean \pm SE (n=7~8). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ vs vehicle.

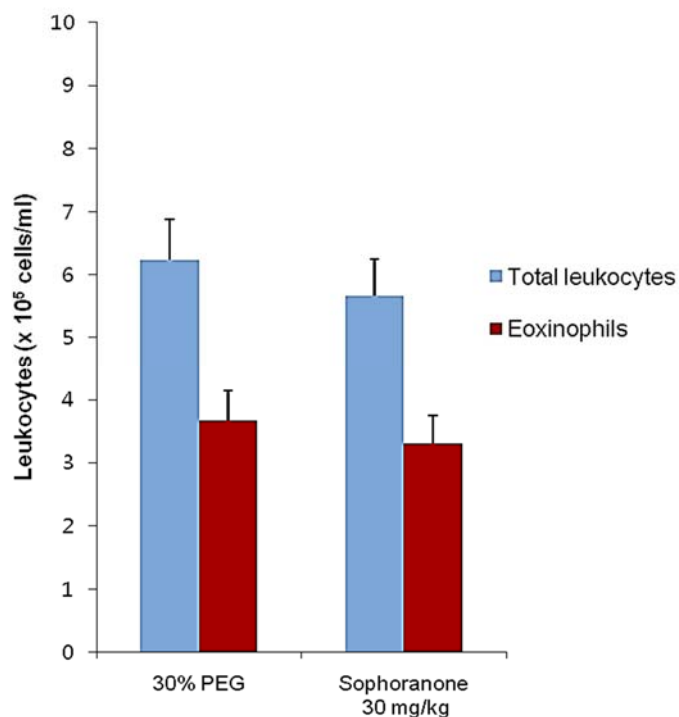


Figure 21. Effects of compound **4** (sophoranone) on the infiltration of inflammatory cells in BALF. Female BALB/c mouse was challenged with 1% OVA inhalation (at day 22, 24) to induce allergic inflammation after sensitization with 50 µg OVA and 500 µg alum (at day 0, 7, 14). BALF was obtained from each group 1 day after last challenge, and the number of total leukocytes and eosinophils were determined. Animals were orally administered with 30% PEG or compound (at day 22 ~ 24; suspended in 30% PEG). Results are shown as mean \pm SE (n=8)

폐는 적출하여 10% 포르말린액에 고정한 후 H&E와 PAS 염색을 통해, 혈관 및 세기관지 주변으로의 염증 세포 침윤, 폐포염 및 술잔세포 증식을 각 0 ~ 3점 척도로 염증 정도를 평가하였다 (Table 3). 기관지세척액 (BALF) 내 염증세포 침윤결과와 마찬가지로 maackiain 30 mg/kg 투여군은 염증의 발현, 술잔세포의 증식이 억제됨을 확인할 수 있었다.

Table 3. Histopathological changes by major compounds in OVA-challenged BALB/c mice. The histopathological findings of each section were classified into four characteristic categories of observation (perivascular or periairway infiltration of inflammatory cells, alveolitis and goblet cell hyperplasia). The parameters were graded from score 0 to 3, with not remarkable lesion (0), minimal lesion (0.5), mild lesion (1), moderate lesion (2), marked lesion (3). Each data shown as mean \pm SE (n=8).

Group	Dose (mg/kg)	Peri-Vascular inflammation	Peri-Airway inflammation	Alveolitis	Sum
Saline	-	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
0.5% CMC	-	1.3 \pm 0.1	0.8 \pm 0.0	1.5 \pm 0.1	3.6 \pm 0.2
Rolipram	10	0.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	2.6 \pm 0.2
Trifolirhizin	50	1.4 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	3.5 \pm 0.2
Maarckiaian	10	1.1 \pm 0.1	0.9 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	3.1 \pm 0.1
	30	0.9 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.0	2.9 \pm 0.1
30% PEG	-	1.3 \pm 0.1	0.9 \pm 0.1	1.0 \pm 0.0	3.2 \pm 0.1
Sophoranone	30	1.1 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	3.1 \pm 0.2

2.3. 산두근 *n*-BuOH 분획의 항천식 효과

앞서 분리된 활성성분들의 경우 가장 활성이 우수한 산두근 *n*-BuOH 층 대비 수율이 낮고 여러 가지 위험인자의 복합적인 인과관계에 의하여 발생하는 다인성 질환인 천식에 대한 multifunction 효과를 충분히 얻기는 어렵다고 판단하였다. 이에 상업적으로 생산이 가능하고 multifunction 효과를 기대할 수 있는 산두근 *n*-BuOH 층을 천식치료제 후보물질을 도출하는 것이 타당하다고 판단하였다. 이에 산두근 *n*-BuOH 층을 SKI3301로 명명하고 항천식 효과 검증을 위해 다양한 약효, 기전 연구를 수행하였다.

2.3.1. *In vitro* 기도수축 억제

천식은 가역적 기도 폐색을 주요 증상으로 하는 만성 염증성 질환이다. 알러젠을 비롯한 다양한 인자에 노출되면, 기침, 호흡곤란 등의 증상이 발생되고, 특히 야간의 천식 발작에 의한 호흡 곤란은 수면 장애로 이어져 삶에 질에 중대한 영향을 미친다. 따라서 천식 치료의 주요 목표는 천식 증상을 없애거나 최소화하고, 정상적인 폐기능을 유지하는 것이다 (Holgate et al., 2004; Hanania, 2007). 따라서 기도 수축을 억제하거나 확장할 수 있는 약물 개발은 천식치료제의 주요 타겟중의 하나이다. 감작된 기니픽으로부터 분리한 적출기관지에 OVA를 투여하여 기도수축을 유발하는 급성 기도과민성 모델 (Jones et al., 1988)을 이용하여 SKI3301이 기도 저항에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

수동 감작된 기니픽의 기관지를 적출하여 안정화한 후, OVA를 가해

유발되는 기관지 수축을 측정하였다. Carbachol 100 µg/ml을 가해 얻어지는 기관지 수축을 100%로 하여 각각의 수축율을 계산하였다. 용매 대조군의 경우 OVA에 의해 84.9%의 수축율을 나타내었고, 본 시험 모델에서 약효가 알려진 rolipram의 경우 (Underwood et al., 1994) 10 µM에서 27.8%의 수축율로 유의적인 억제 효과를 나타내었다. SKI3301은 50, 100, 200 µg/ml에서 50.3, 32.9, 및 16.3%의 수축율을 나타내 OVA에 수축을 용량의존적으로 억제하는 것으로 나타났다. 이에 반해 montelukast의 경우 10 µM에서 유의적인 억제 효과를 보이지 못했다. Vehicle (0.5% DMSO)의 경우 $84.9 \pm 4.3\%$ 의 수축율을 나타내었고, 양성 대조물질로 사용한 rolipram의 경우 10 µM에서 $27.8 \pm 9.1\%$ 의 수축율을 보여 유의적인 억제 효과 (억제율 67%)를 나타내었다. OVA에 의한 수축 유도 후, 3번째로 가한 carbachol에 의해서도 2번째 carbachol시와 동등한 정도의 수축이 유발되었다 (Figure 22).

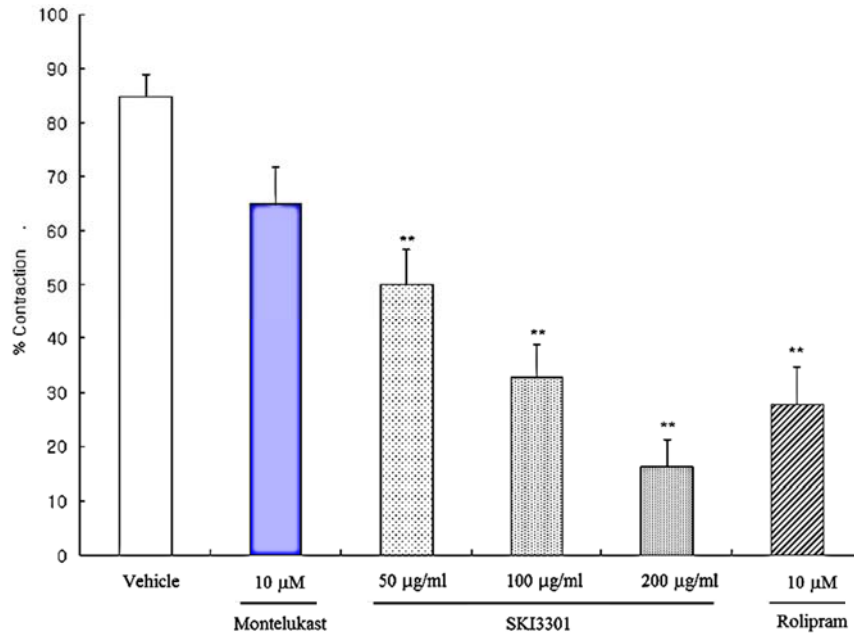


Figure 22. Effects on OVA-induced contraction of isolated trachea from sensitised guinea pigs. Naive guinea pigs were sensitised by intravenous injection of anti-OVA-antiserum (1.5 ml/kg) and the guinea pig were used 48 h later. Isolated trachea was pretreated with 10 nM indomethacin before 10 µg/ml OVA challenge. The contraction was expressed as a percentage of the maximum carbachol response. Each data represents the mean \pm SEM (n=5~6). ** $p < 0.01$ vs vehicle

2.3.2. *In vivo* 기도수축 억제

SJI3301의 *in vivo* 기도수축 억제 작용을 평가하고자 알러지성 모델인 ovalbumin으로 유도한 기도수축 모델과 SRS-A (Slow Reacting Substance of Anaphylaxis) 의존성 기도수축 모델을 사용하였다. SRS-A는 천식 질환에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 주성분은 Leukotriene D4를 비롯한 arachidonic acid의 대사 산물로 알려져 있다 (Morris et al., 1980). 또한 Anderson 등에 의하면 감각된 기니픽에 indomethacin, pyrilamine, 그리고 propranolol을 전처리함으로써 SRS-A 의존성 기도수축을 유발할 수 있다고 보고되었다 (Anderson et al., 1983).

Ovalbumin으로 유도한 기도수축 억제 작용을 평가하고자 우선 아나필락시스에 의한 치사를 예방하고, 수축을 강화하기 위해 항히스민제인 mepyramine (0.5 mg/kg)과 beta adrenergic receptor antagonist인 propranolol (0.05 mg/kg)을 전처리 하였다. Ovalbumin 분무에 의해 유발된 기도수축 정도를 알아보기 위해 15분 동안 기도저항을 측정한 결과, 용매 대조군과 비교해 SKI3301은 200 mg/kg과 400 mg/kg에서 55.2%의 유의적인 기도수축 억제효과를 나타내는데 반해, montelukast의 경우 10, 30 mg/kg에서 유의적인 억제 효과를 나타내지 못했다 (Figure 23).

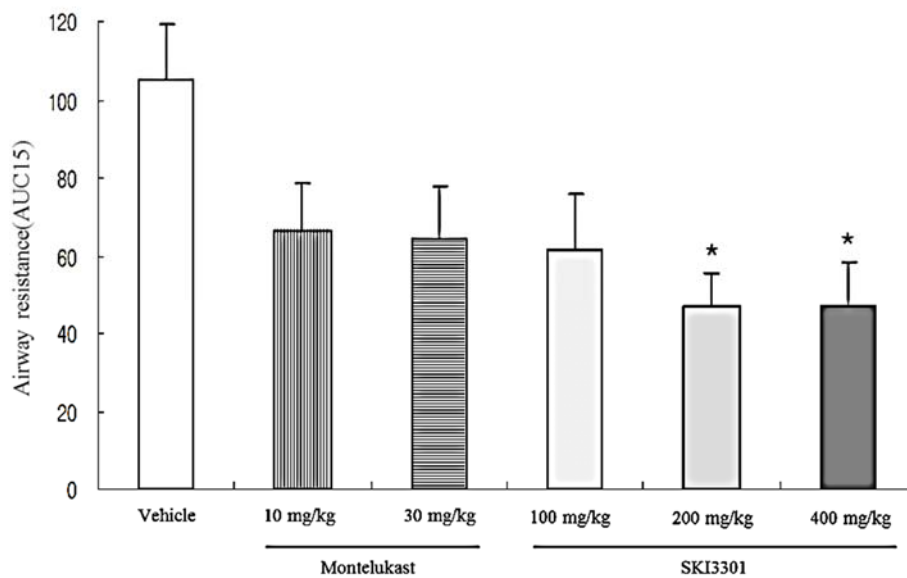


Figure 23. Effects on OVA-induced bronchoconstriction of passively sensitized conscious guinea pigs. AUC15 means the area under the curve of airway resistance for 15 min. Each data represents the mean \pm SE of 12 animals. * $p < 0.05$ vs vehicle

다음으로 montelukast의 억제기전으로 알려져 있는 SRS-A 의존성 기도수축에서의 효과를 평가하고자 하였다. Ovalbumin으로 유도한 기도수축 억제 작용 평가에서와 마찬가지로 아낙필락시스에 의한 치사를 예방하고, SRS-A에 의존한 기도 수축을 유발하기 위해, OVA 분무 30분 전에 mepyramine 10 mg/kg, propranolol 0.1 mg/kg, indomethacin 10 mg/kg을 전처리하였다. Ovalbumin 분무에 의해 유발된 기도수축 정도를 알아보기 위해 30분 동안 기도저항을 측정한 결과, 용매 대조군과 비교해 SKI3301은 100, 200 mg/kg에서 각각 19.30, 56.7%의 억제 효과를 나타내었다. 반면, montelukast는 10 mg/kg에서 52.8%의 유의적인 억제 효과를 나타내었다 (Figure 24).

SRS-A 의존성 *in vivo* 기도수축 모델에서 SKI3301과 montelukast는 유의적인 억제 효과를 나타내었다. Montelukast가 SRS-A 의존성 모델에서만 효과를 나타내고 나머지 두 모델에서 효과가 없는 것은 montelukast가 LTD4 수용체만 작용하는 길항제이고, LTD4 이외 다른 mediators 예를 들면, arachidonic acid, histamine, serotonin, acetylcholine 등에 대해서는 약효가 없기 때문으로 생각된다 (Jones et al., 1995). SKI3301의 경우 기전 연구에서 5-lipoxygenase, phosphodiesterase 3/4, thromboxane synthase의 작용을 억제하는 것으로 나타났고, 위의 기전 억제제들은 다양한 기도 수축/염증 모델에서 억제효과를 가지는 것으로 알려져 있다 (Anderson et al., 1983; Fukushima et al., 1998). 종합하면 SKI3301은 다양한 *in vitro*, *in vivo* 모델에서 기도 수축을 억제하였으며, 천식 환자에서의 기도 수축에 다양한 매개체가 관여한다는 사실을 고려할 때, montelukast 대비 임상에서 천식의 주요 증상을 효과적으로 억제할 가능성이 큼을 시사한다.

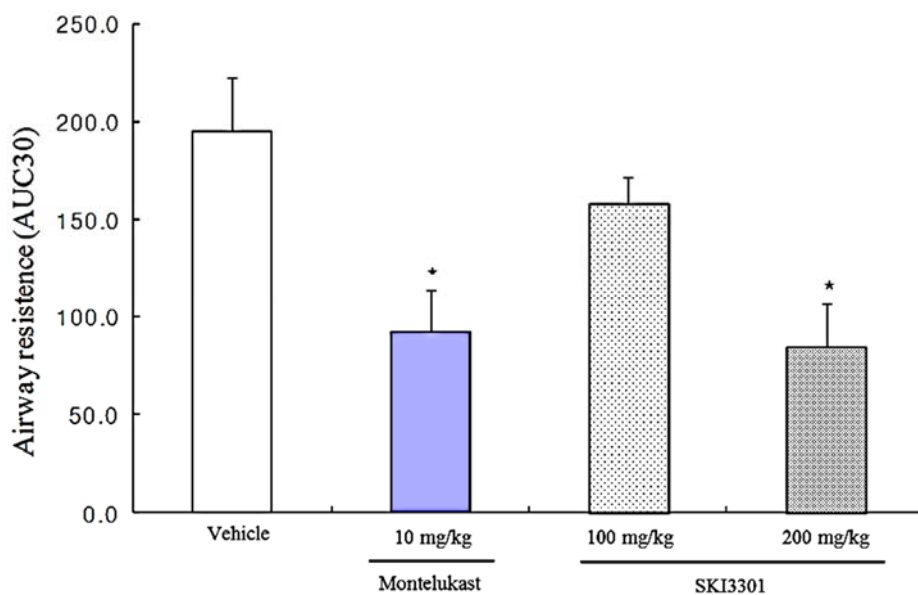


Figure 24. Effects on SRS-A dependent bronchoconstriction in sensitized guinea pigs. AUC30 means the area under the curve of airway resistance for 30 min. Each data represents the mean \pm SE (n=8~9). * $p < 0.05$ vs vehicle

2.3.3. *in vivo* 기도염증 억제

Sakai 등은 감작에 사용하는 항원의 양과 유발되는 천식염증의 관여 인자 사이에 밀접한 관계가 있음을 제시하였다 (Sakai et al., 1999). 즉, BALB/c 마우스에 마우스 개체당 10 µg의 OVA와 alum으로 감작하면, IgE 항체가 주로 생성되며, OVA 분무에 의해 Th2 세포와 관련된 cytokines의 생성이 증가되고 기관지세척액 (BALF) 중의 백혈구도 호산구가 78% 정도로 호산구성 천식 염증이 유발된다는 것이다. 본 시험에서도 호산구성 천식을 유발하기 위해, 개체당 10 µg의 OVA과 alum을 복강내에 투여하여 감작한 후 1%OVA를 분무하여 천식염증을 유발하고, 기관지세척액 (BALF) 중의 백혈구 증가, 백혈구 분별계수 및 폐조직을 염색하여 염증 유발을 평가하였다. 1% OVA를 분무한 유발대조군의 경우 기관지세척액 (BALF) 중의 백혈구수가 8.13×10^5 cells/ml로 비유발군의 1.43×10^5 cells/ml에 비해 유의적인 증가를 나타내었다. 기관지세척액 (BALF) 중의 호산구 비율은 비유발군은 0%인데 반해 유발대조군의 경우 62%로 나타났다 (Figure 25).

마우스 폐장에 대한 조직병리학적 검사 결과, 비유발군은 모든 관찰에서 염증 소견이 없는 것으로 나타났다. 유발대조군의 경우 혈관과 기도주변의 염증 세포 침윤, 폐포염증 등이 증가하였다. 위와 같은 결과로부터 Th2 세포가 주로 관여되는 호산구성 천식이 유발되었음을 알 수 있었다. SKI3301의 경우 100, 200 mg/kg 투여 용량에서, 폐기관지 내로의 호산구를 비롯한 백혈구의 증가를 유의적으로 억제하였다. 또한 마우스 폐장에 대한 조직병리학적 검사 결과 SKI3301은 100, 200 mg/kg 투여시 폐조직의 염증 소견이 유발대조군과 비교하여 유의적으

로 억제되었다. 양성 대조물질로 사용한 montelukast의 경우 10 mg/kg에서 기관지세척액 (BALF) 내로의 백혈구 증가는 유의적으로 억제하였지만, SKI3301 200 mg/kg 투여군보다 억제 효과가 낮았으며, 특히 폐조직 소견에서는 유발대조군 대비 유의적인 억제 효과를 나타내지 못했다. 이에 반해 SKI3301 200 mg/kg 투여군은 폐조직 소견에서 혈관주위 및 기도주위염증세포침윤과 폐포염 (alveolitis) 모두 중등도 이하의 정도로 확인되어 가장 효과가 좋은 것으로 나타내었으며, montelukast 10 mg/kg과 비교하여 유의적인 억제 효과를 나타내었다 (Table 4).

이상의 결과에서, 감염된 BALB/c 마우스에 OVA를 분무하여 천식 염증을 유발한 천식 염증 지표에 대해 SKI3301은 100, 200 mg/kg에서 용량상관성 있는 억제 효과를 나타내었다. 또한 SKI3301 200 mg/kg의 효과는 양성대조물질인 montelukast 10 mg/kg 대비 우수한 것으로 나타나, SKI3301이 우수한 천식치료제 후보물질임을 시사한다.

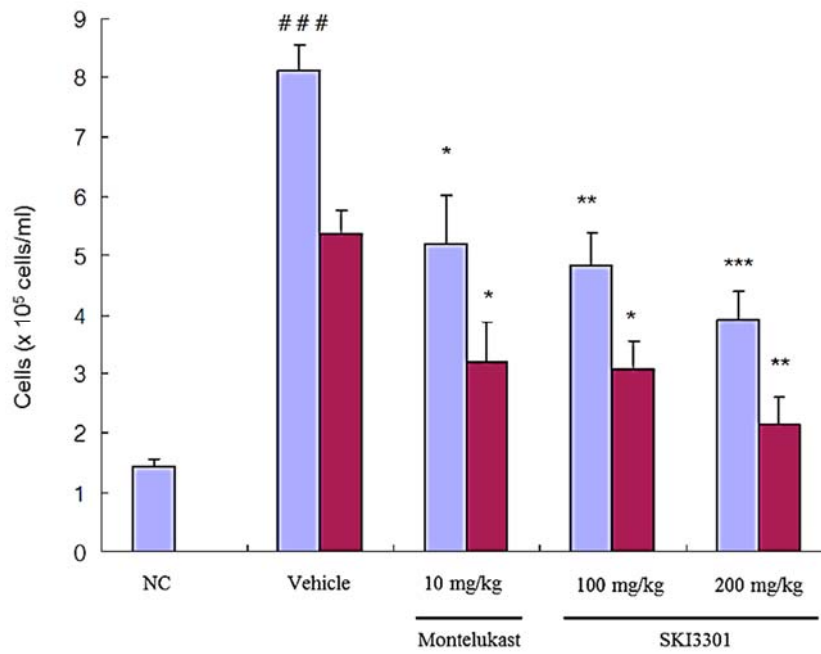


Figure 25. Effects on WBC infiltration in BALF in challenged BALB/c mice. Each data represents the mean \pm SE (n = 6 ~ 8). Blue bar: WBC, Red bar: Eosinophil; ### $p < 0.001$ vs NC. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs vehicle

Table 4. Histopathological changes by samples in OVA-challenged BALB/c mice.

Each data represents the mean \pm S.E. The intensity was graded as followed. Not remarkable (0), Minimal (0.5), Moderate (2), Marked (3). *** $p < 0.001$ vs vehicle.

$p < 0.05$ vs montelukast 10 mg/kg

Group	Severity grade				
	Infiltration of inflammatory cells		Alveolitis	Goblet cell hyperplasia	Sum
	Perivascular	Periairway			
Vehicle	2.5 \pm 0.2	2.1 \pm 0.2	2.4 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	8.6 \pm 0.6
Montelukast 10 mg/kg	2.1 \pm 0.2	1.8 \pm 0.2	2.0 \pm 0.3	1.1 \pm 0.1	7.0 \pm 0.4
SKI3301 100 mg/kg	2.0 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3	1.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.1	6.2 \pm 0.7***
SKI3301 200 mg/kg	1.6 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2	0.8 \pm 0.1	5.0 \pm 0.6***, #

2.3.4. 기전연구

SKI3301의 약효 기전을 알아보기 위해, 천식과 관련된 30여종의 targets에 대한 억제 효과를 살펴보았으며 (data not shown), 이중 SKI3301이 높은 억제 효과를 보였던 4개의 효소에 대해 농도 의존성 시험을 수행하였다. 천식의 작용기전에서 5-lipoxygenase (5-LO)의 작용으로 인해 염증세포들 (mast cell, basophil, eosinophil)에서 LTC₄, LTD₄, LTE₄가 합성된다. LTB₄는 강력한 neutrophil과 eosinophil의 화학주성인자이고 LTC₄, LTD₄는 천식시 나타나는 기도수축, 기도과민성, 점막부종, 점액 분비 등을 매개한다. 따라서 5-LO의 억제제는 이러한 leukotrienes의 작용을 차단하는 역할을 한다. 특히 5-LO의 억제제인 zileuton의 경우 임상에서의 유효성이 입증되어 천식 치료제로 사용되고 있다 (Carter et al., 1991; Safayhi H. et al., 2000). 또, Phosphodiesterase (PDE)는 세포내 기질의 cyclic nucleotides를 가수분해하고 다양한 염증세포와 기도의 구조적인 세포에 존재한다. PDE의 저해제들은 다양한 airway smooth muscle의 확장과 세포염증 및 염증 반응의 저해 등, 다양한 세포내 작용들의 cAMP와 cGMP들의 상승에 효과적이다 (Hidaka et al., 1976b). 선택적인 PDE3 저해제는 기관지확장제의 역할을 하고 선택적인 PDE4 저해제는 넓은 범위의 항염증 효과 (염증 세포로부터 cytokine과 chemokine의 방출을 저해)를 가지는데 PDE4 저해제가 천식 증상을 억제한다는 것이 임상을 통해 입증되었다 (Nicholson et al., 1991; Cortijo et al., 1993). Thromboxane Synthase (TxS)는 platelets, monocytes, macrophages, neutrophils 그리고 lung parenchyma 등에서 주로 생산되는데 혈소판 모양변화와 응집에 중요한 자극제 역할을 할 뿐만 아니라

smooth muscle 구조와 증식, 기도과민에도 중요한 역할을 한다. 이러한 thromboxane synthase는 천식과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다 (Dogné et al., 2002).

5-LO assay에서 SKI3301은 각 농도별로 다음과 같이 농도의존적인 억제 효과를 나타내었다 (Figure 26). 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 97%, 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 77%, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 28%, 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 7% 저해율로 용량의존적인 결과를 나타내었다. 5-LO에 대한 IC_{50} 값은 1.61 $\mu\text{g/ml}$ 으로 계산되었다. 양성 대조물질로 사용한 nordihydrogaiairetic acid (NDGA)의 IC_{50} 값은 89.5 nM이었다.

PDE3 assay에서 SKI3301은 각 농도별로 다음과 같이 농도의존적인 억제 효과를 나타내었다 (Figure 27). 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 79%를 나타내었고, 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 77%를, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 48%, 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 23%, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 -8%의 저해율로 용량의존적인 결과를 나타내었다. PDE3에 대한 IC_{50} 값은 11.8 $\mu\text{g/ml}$ 으로 계산되었다. 양성 대조물질로 사용한 cilostamide의 IC_{50} 값은 57.5 nM이었다.

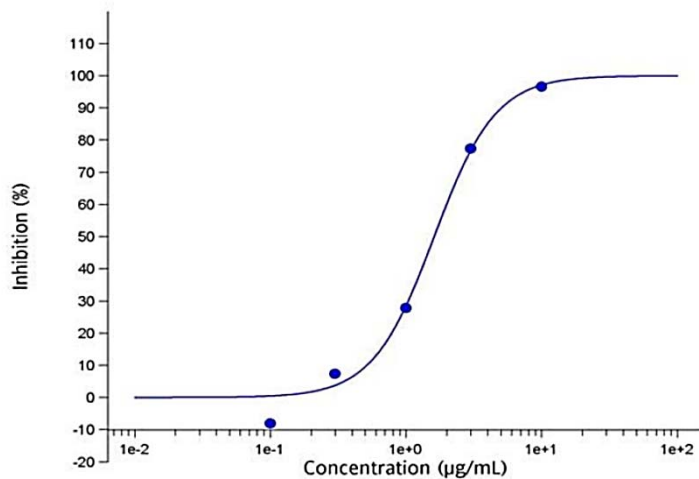


Figure 26. Inhibitory effect on 5-lipoxygenase activity in human PBML cells. LTB₄ production was measured from arachidonic acid. PBML cells. Each data represents the mean of 2 tests

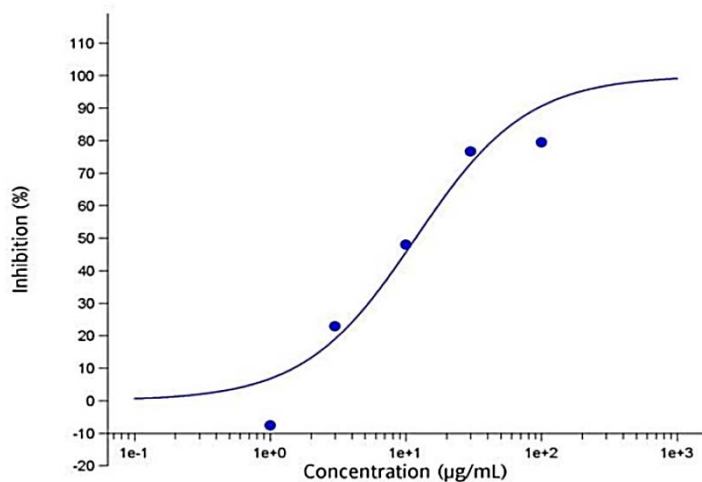


Figure 27. Inhibitory effect on PDE3 enzyme activity in human platelets. [³H]Adenosine production was measured from [³H]cAMP + cAMP. Each data represents the mean of 2 tests

PDE4 assay에서 SKI3301은 각 농도별로 다음과 같이 농도의존적인 억제 효과를 나타내었다 (Figure 28). 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 94%를 나타내었고, 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 94%, 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 63%, 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 35%, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 10%의 저해율로 용량의존적인 결과를 나타내었다. PDE4에 대한 IC_{50} 값은 5.56 $\mu\text{g/ml}$ 으로 계산되었다. 양성 대조물질로 사용한 Ro 20-1724의 IC_{50} 값은 1.21 μM 이었다.

TxS assay에서 SKI3301은 각 농도별로 다음과 같이 농도의존적인 억제 효과를 나타내었다 (Figure 29). 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서 97%, 3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 77%, 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서 55%, 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 에서 39%, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 17%의 저해율로 용량의존적인 결과를 나타내었다. TxS에 대한 IC_{50} 값은 0.634 $\mu\text{g/ml}$ 으로 계산되었다. 양성 대조물질로 사용한 1-(7-carboxyheptylimidazole)의 IC_{50} 값은 7.6 nM이었다.

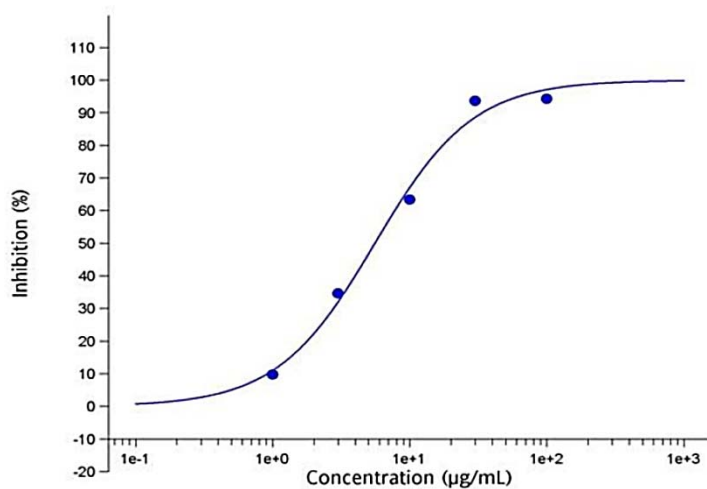


Figure 28. Inhibitory effect on PDE4 enzyme activity in human U937 cells. $[^3\text{H}]$ Adenosine production was measured from $[^3\text{H}]$ cAMP + cAMP. Each data represents the mean of 2 tests

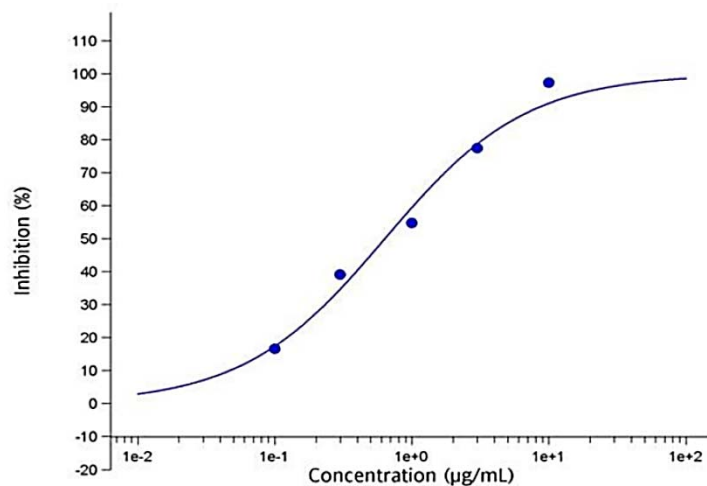


Figure 29. Inhibitory effect on thromboxane synthase in human platelets. Thromboxane B₂ production was measured from PGH₂. Each data represents the mean of 2 tests

앞서 기술한 바와같이 천식은 다양한 염증성 세포와 염증성 매개물이 중요한 역할을 하는 기도의 만성염증성 질환이다. 특히 지속성 천식 환자에서는 천식의 증상 및 염증 조절이 한 가지 방법에 의해서는 쉽지 않아 여러 가지 약제를 동시에 병용 투여하여 치료효과를 높이는 방법이 사용되고 있다. 따라서 다양한 성분과 기전을 갖는 천연물 추출물이 효과적인 치료제가 될 수 있다고 판단하여 SKI3301을 얻게 되었고, 위에서와 같이 SKI3301의 약효에는 위의 4가지 기전이 관여하는 것으로 판단된다. 결론적으로 SKI3301은 5-LO 억제를 통해 LTB₄에 의한 염증반응 억제와 SRS-A 억제에 의한 기관지 수축억제를, smooth muscle의 PDE3와 TxS 억제를 통해 기관지 수축억제를, PDE4와 IL-6 생성, 호산구의 기관지 침윤 억제를 통해 기관지 염증 억제효과를 나타냄을 추론할 수 있었다 (Figure 30). 이러한 결과로부터 SKI3301은 기존에 경구용 항천식 약물로 개발된 zileuton (5-LO 억제제) 및 montelukast (LTD₄ 억제제)보다 다양한 천식 매개인자를 억제함으로써 다인성 기전에 의해 치료가 어려운 천식의 기도수축과 염증을 보다 효과적으로 억제할 수 있음을 시사한다.

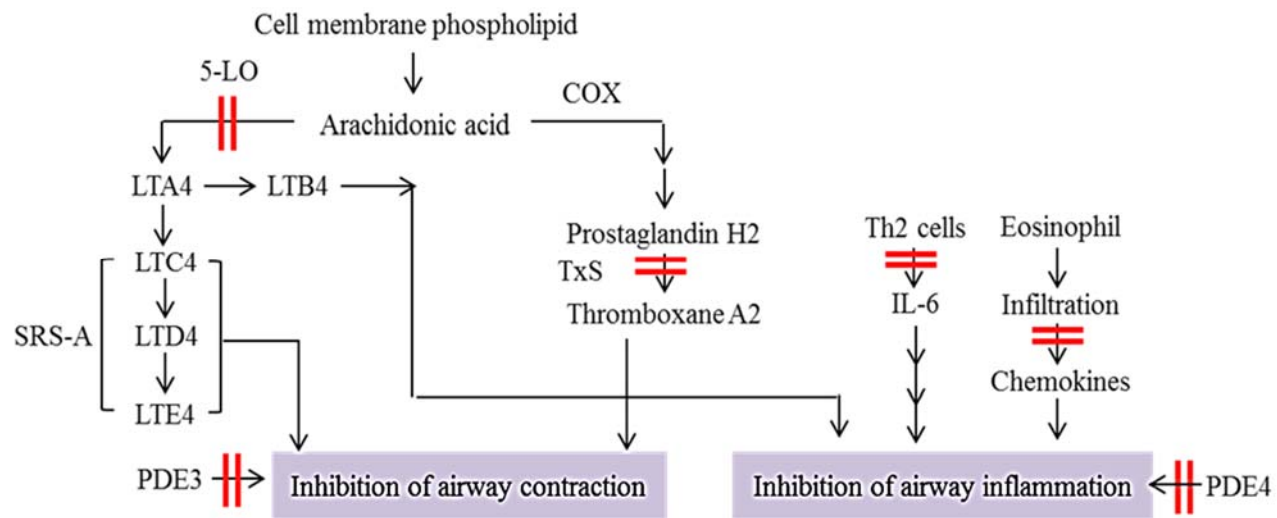


Figure 30. The proposed mechanism of SKI3301

3. 배치간 유사도 평가

천연물 추출물로부터 의약품을 개발하는데 있어 가장 큰 어려움중의 하나는 어떻게 다양한 구성성분을 효과적으로 관리하고 일관성있게 제조하는가이다. 다시말해 천연물의 특성상 기원, 산지, 기후 등에 의해 구성성분의 종류와 함량이 변화할 수 있어 개발단계에서의 품질이 상업화 이후와 동일함을 보증하는 것이 매우 중요하다 할 수 있다. 이러한 문제를 극복하기 위해 다양한 chromatographic technique를 활용한 연구들이 진행되어 오고 있는데 (Liang et al., 2004; Xie et al., 2006) 본 연구에서는 실험실적으로 구현이 간편하고 활용도가 높은 HPLC-DAD를 사용해 배치간 동등성을 입증하고자 하였다.

9개 시료의 chromatogram으로부터 전체 peak의 90% 이상을 대별할 수 있도록 0.2 % 이상의 면적을 갖는 peak를 선정해 평균 chromatogram (Figure 31)을 구하고 각 시료의 이에 대한 Pearson correlation coefficient를 구하였다. 본실험에서 모두 0.92 이상의 높은 동등성이 나타나는 것을 확인하였고 (Table 5.) 이러한 결과는 식품의약품 안전처의 “생약(한약)제제의 성분 프로파일 설정 가이드라인 (2010.11)”을 충족하였다. 이로부터 시험에 사용된 원생약 관리 및 SKI3301 제조의 일관성을 입증할 수 있었다.

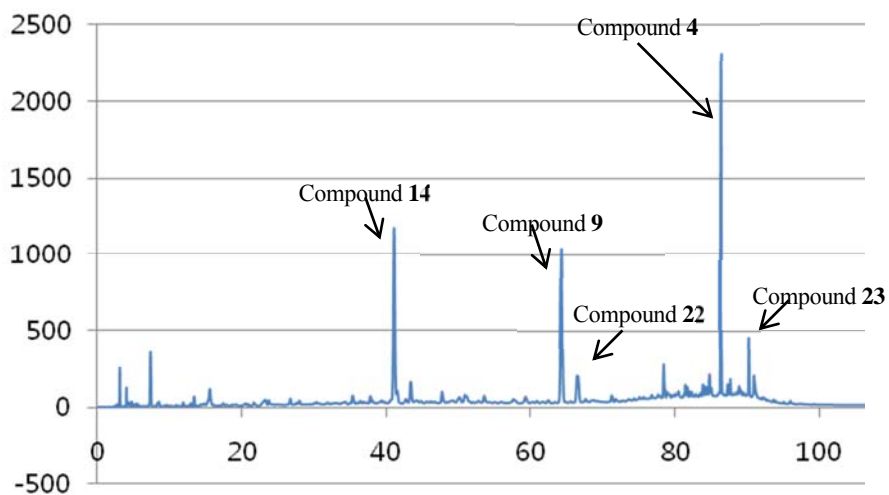


Figure 31. Mean chromatogram of 9 major batches

Table 5. Pearson correlation coefficients on mean chromatogram about 9 major batches

Batch	Pearson correlation coefficient
Bx1	0.9200
Bx2	0.9711
Bx3	0.9804
Bx4	0.9850
Bx5	0.9717
Bx6	0.9587
Bx7	0.9636
Bx8	0.9818
Bx9	0.9801

IV. 결론

1. 다양한 문헌 및 자체 DB검색을 통해 약 600여종의 후보생약 중 30여종을 거쳐 최종 후보로 산두근을 선정하였다. 산두근 활성분획을 추적한 결과 *n*-BuOH 분획이 가장 활성이 좋았고 해당 분획물로부터 3종의 (화합물 **1, 2, 3**) 신규 미지물질과 20종의 기지물질을 규명하였다.
2. 기지물질 화합물 **4 – 23**은 sophoranone (**4**), glabrol (**5**), 2-(2',4'-dihydroxyphenyl)-8,8-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-8*H*-pyrano[2,3-*d*]chroman-4-one (**6**), 6,8-diprenyl-7,2',4'-trihydroxyflavanone (**7**), tonkinochromane A (**8**), maackiain (**9**), medicarpin (**10**), maackiain-3-*O*-glucoside 6"-acetate (**11**), medicarpin 3-*O*-glucoside 6"-acetate (**12**), pterocarpin (**13**), trifolirhizin (**14**), sophoranochromene (**15**), isoliquiritigenin (**16**), maackiapterocarpin B (**17**), formononetin (**18**), genistein (**19**), 7,4'-dihydroxyflavone (**20**), bolusanthin IV (**21**), 2-(2',4'-dihydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxybenzofuran (**22**), sophoradin (**23**)으로 규명하였다.
3. 화합물 **1, 5, 9, 21**는 IL-6 생성을 IC₅₀ 1.62, 0.73, 3.01, 4.02 μ M 수준에서 강하게 억제함을 알 수 있었고 최종 활성분획물의 대표 marker 화합물 (화합물 **4, 9, 14**) 중 maackiain (화합물 **9**)은 *in vivo* murine asthma 염증세포 침윤 및 IL-6 생성 억제 활성을 보여 QC를 위한 active marker로 선정할 수 있음을 확인하였다.
4. 가장 활성이 좋았던 산두근 *n*-BuOH 분획을 SKI3301로 명명하고 다양한

in vitro, in vivo model 약효연구를 통해 SKI3301이 천식치료에 우수한 효능을 지님을 확인하였다.

5. HPLC-PDA similarity evaluation을 통해 원생약 QC과 SKI3301 제조공정의 robustness 및 batch-to-batch consistency를 검증하였다.

V. 참고문헌

김영택. 아토피 천식 예방관리 종합대책. 2008년 대한 천식 및 알레르기학회 춘계학술대회. 일자 2008년 5월 9일 ~ 10일. 장소 서울 그랜드힐튼 호텔 S143-S150.

박정안. 산두근(*Sophora subprostrata*)의 化學成分 및 抗癌活性에 對한 연구. 경희대학교 석사학위 논문, 2002, 24 – 46.

홍수종, 안강모, 이수영, 김규언. 한국 소아알레르기 질환의 유병률. *Korean Journal of Pediatrics*, 2008, **51**, 343 – 350.

The Korean Herbal Pharmacopoeia, 154, 2002.

Anderson, W.H., O'Donnell, M., Simko, B.A. and Welton, A.F. An in vivo model for measuring antigen-induced SRS-A-mediated bronchoconstriction and plasma SRS-A levels in the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology*, 1983, **78**, 67 – 74.

Ahn K.S., Kim, J.H., Oh, S.R., Min, B.S., Kinjo, J. and Lee, H.K. Effects of oleanane-type triterpenoids from fabaceous plants on the expression of ICAM-1. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, **8**, 1105 – 1107.

Ao, C., Araki, N. and Tawata, S. Cyclooxygenase inhibitory compounds with antioxidant activities from *Sophora subprostrata*. *Asian Journal of Chemistry*, 2009,

21, 745 – 754.

Atta-ur-Rahman., Haroone, M.S., Tareen, R.B., Mesaik, M.A., Jan, S., Abbaskhan, A., Asif, M., Gulzar, T., Al-Majid, A.M., Yousuf, S. and Choudhary, M.I. Secondary metabolites of *Sophora mollis* subsp. *griffithii* (Stocks) Ali. *Phytochemistry Letters*, 2012, **5**, 613 – 616.

Balkissoon R. Asthma overview. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 2008, **35**, 41-60.

Bernstein D.I. ABCs of Asthma. *Clinical Cornerstone*, 2008, **8**, 9 – 25.

Bjermer, L. Time for a paradigm shift in asthma treatment: from relieving bronchospasm to controlling systemic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007, **120**, 1269 – 1275.

Bleecker, E.R., Welch, M.J., Weinstein, S.F., Kalberg, C., Johnson. M., Edwards, L. and Rickard, K.A. Low-dose inhaled fluticasone propionate versus oral zafirlukast in the treatment of persistent asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2000, **105**, 1123 – 1129.

Bloemen, K., Verstraelen, S., Van Den Heuvel, R., Witters, H., Nelissen, I., Schoeters, G. The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunology Letters*, 2007, **113**, 6 – 18.

Börsch-Haubold, A.G., Pasquet, S. and Watson, S.P. Direct inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by the kinase inhibitors SB 203580 and PD 98059. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, **273**, 28766 – 28772.

Broide, D.H., Lotz, M., Cuomo, A.J., Coburn, D.A., Federman, E.C. and Wasserman, S.I.. Cytokines in symptomatic asthma airways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1992, **89**, 958 – 967.

Caligiani, A., Palla, G., Maietti, A., Cirlini, M. and Brandolini, V. ¹H NMR fingerprinting of soybean extracts, with emphasis on identification and quantification of isoflavones. *Nutrients*, 2010, **2**, 280 – 289.

Carter, G.W., Young, P.R., Albert, D.H., Bouska, J., Dyer, R., Bell, R.L., Summers, J.B. and Brooks, D.W. 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1991, **256**, 929 – 937.

Cho, C.H. and Chuang, C.Y. Study of the anti-inflammatory action of matrine: An alkaloid isolated from *Sophora subprostrata*. *IRCS Journal of Medical Science*, 1986a, **14**, 441 – 442.

Cho C.H., Chuang CY. and Chen CF. Study of the Antipyretic Activity of Matrine. A Lupin Alkaloid Isolated from *Sophora subprostrata*. *Planta Medica*, 1986b, **52**, 343-345.

Cho, S.H., Park, H.W. and Rosenderg, D.M. The current status of asthma in Korea. *Journal of Korean Medical Science*, 2006, **21**, 181-7.

Cho, S., Park, Ji.H., Pae, A. N., Han, D., Kim, D., Cho, N.C., No, K.T., Yang, H., Yoon, M., Lee, C., Shimizu, M., Baek, N.I. Hypnotic effects and GABAergic mechanism of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) ethanol extract and its major flavonoid constituent glabrol. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2012, **20**, 3493 – 3501.

Choi, C.W., Choi, Y.H., Cha, M.R., Kim, Y.S., Yon, G.H., Kim, Y.K., Choi, S.U., Kim, Y.H. and Ryu, S.Y. Antitumor components isolated from the heartwood extract of *Dalbergia odorifera*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2009, **52**, 375 – 379.

Cortijo, J., Bou, J., Beleta, J., Cardelús, I., Llenas, J., Morcillo, E. and Gristwood, R. W. Investigation into the role of phosphodiesterase IV in bronchorelaxation, including studies with human bronchus. *British Journal of Pharmacology*. 1993, **108**, 562 – 568.

Deng, Y.H., Xu, K.P., Zhou, Y.J., Li, F.S. Zeng, G.Y. and Tan, G.S. A new flavonol from *Sophora tonkinensis*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2007, **9**, 45 – 48.

Diamant, Z., Boot, J.D. and Virchow, J.C. Summing up 100 years of asthma. *Respiratory Medicine*, 2007, **101**, 378 – 388.

Dienz, O. and Rincon, M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clinical Immunology*, 2009, **130**, 27 – 33.

Ding, Y., Takeshita, T., Yokoyama, K., Kinjo, J. and Nohara, T. Triterpenoid glycosides from Sophorae Subprostate Radix. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1992, **40**, 139 – 142.

Ding, P.L., Huang, H., Zhou, P. and Chen, D.F. Quinolizidine alkaloids with anti-HBV activity from *Sophora tonkinensis*. *Planta Medica*, 2006, **72**, 854 – 856.

Dogné, J.M., de Leval, X., Benoit, P., Delarge, J., Masereel, B. Thromboxane A2 inhibition: therapeutic potential in bronchial asthma. *American Journal of Respiratory Medicine*, 2002, **1**, 11 – 7.

Dou, J.H., Li, J.S. and Yan, W.M. Studies on the alkaloids of Radix Sophorae Tonkinensis. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 1989, **14**, 296-298

Erasto, P., Bojase-Moleta, G., Majinda, R.R. Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the root wood of *Bolusanthus speciosus*, *Phytochemistry*, 2004, **65**, 875 – 880.

Fukushima, C., Shimoda, T., Matsuse, H., Matsuo, N., Takao, A., Obase, Y., Kohno, S. and Asai, S. Effect of synthetase inhibitors and receptor antagonists in antigen-induced contraction of human lung parenchyma. *Annals of Allergy, Asthma &*

Immunology, 1998, **80**, 245 – 250.

Gudipaty, L., Humphreys, B.D., Buell, G. and Dubyak, G.R. Regulation of P2X₇ nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density. *The American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2001, **280**, C943 - C953.

Hanania N.A. Revisiting asthma control: how should it best be defined? *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2007, **20**, 483 – 492.

Hidaka, H. and Asano, T. Platelet cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase releases by thrombin and calcium ionophore. *The Journal of Biological Chemistry*, 1976a, **251**, 7508 – 7516.

Hidaka, H. and Asano, T. Human blood platelet 3':5' cyclic nucleotide phosphodiesterase. Isolation of low-K_m and high K_m phosphodiesterase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1976b, **429**, 485 – 497.

Holgate, S.T., Bousquet, J., Chung, K.F., Bisgaard, H., Pauwels, R., Fabbri, L., Rabe, K., Doherty, M., Snell, N.J., Cuss, F., D'Amato, M. and Reginster, J.Y. Summary of recommendations for the design of clinical trials and the registration of drugs used in the treatment of asthma. *Respiratory Medicine*, 2004, **98**, 479 – 487.

Hyun, S.K., Lee, W.H., Jeong, D.M., Kim, Y. and Choi, J.S. Inhibitory effects of

kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2008, **31**, 154 – 158.

Iinuma, M., Ohyama, M., Tanaka, T., Mizuno, M. and Hong, S.K. Five flavonoid compounds from *Echinosophora koreensis*. *Phytochemistry*, 1993, **33**, 1241 – 1246.

Ikeda, T., Yokomizo, K., Okawa, M., Tsuchihashi, R., Kinjo, J., Nohara T. and Uyeda, M. Anti-herpes virus type 1 activity of oleanane-type triterpenoids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, **9**, 1779 – 1781.

Jones, TR., Charette, L. and Denis, D. Antigen-induced contraction of guinea-pig isolated trachea: studies with novel inhibitors and antagonists of arachidonic acid metabolites. *British Journal of Pharmacology*, 1988, **95**, 309 – 321.

Jones, T.R., Labelle, M., Belley, M., Champion, E., Charette, L., Evans, J., Ford-Hutchinson, A.W., Gauthier, J.Y., Lord, A. and Masson, P. Pharmacology of montelukast sodium (Singulair), a potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1995, **73**, 191 – 201.

Kajimoto, S., Takanashi, N., Kajimoto, T., Xu, M., Cao, J., Masuda, Y., Aiuchi, T., Nakajo, S., Ida, Y. and Nakaya, K. Sophoranone, extracted from a traditional Chinese medicine Shan Dou Gen, induces apoptosis in human leukemia U937 cells via formation of reactive oxygen species and opening of mitochondrial permeability transition pores. *International Journal of Cancer*, 2002, **99**, 879 – 890.

Kapingu, M.C., Mbwapbo, Z.H., Moshi, M.J., Magadula, J.J., Cos, P., Berghe, D.V., Maes, L., Theunis, M., Apers, S., Pieters, L. and Vlietinck, A. A novel isoflavonoid from *Millettia puguensis*. *Planta Medica*, 2006, **72**, 1341 – 1343.

Kim, B.H., Na, K.M., Oh, I., Song, I.H., Lee, Y.S., Shin, J. and Kim, T.Y. Kurarinone regulates immune responses through regulation of the JAK/STAT and TCR-mediated signaling pathways. *Biochemical Pharmacology*, 2013, **85**, 1134 – 1144.

Kinjo, J.E., Furusawa, J.I., Baba, J., Takeshita, T., Yamasaki, M. and Nohara, T. Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. III. Isoflavonoids and related compounds in the roots and the voluble stems. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1987, **35**, 4846 – 4850.

Kitagawa, I., Chen, W.Z., Hori, K., Harada, E., Yasuda, N., Yoshikawa, M. and Ren, J. Chemical studies of Chinese licorice-roots. I. Elucidation of five new flavonoid constituents from the roots of *Glycyrrhiza glabra* L. collected in Xinjiang. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1994, **42**, 1056 – 1062.

Kojima, R., Fukushima, S., Ueno, A. and Saiki, Y. Antitumor activity of Leguminosae plants constituents. I. Antitumor activity of constituents of *Sophora subprostrata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1970, **12**, 2555 – 2563.

Komatsu, M., Tomimori, T., Hatayama, K., Makiguchi, Y. and Mikuriya, N. Studies

on the constituents of Sophora species. I. Constituents of *Sophora subprostrata* Chun et T. Chen (1). Isolation and structure of new flavonoids, sophoradin and sophoranone. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1970, **18**, 602 – 607.

Komatsu, M., Yokoe, I., Shirataki, Y. and Chen, J. Trifolirhizin 6'-monoacetate, a new glycoside from the roots of *Sophora subprostrata*. *Phytochemistry*, 1976, **15**, 1089 – 1090.

Koysomboon, S., van Altena, I., Kato, S. and Chantrapromma, K. Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. *Phytochemistry*, 2006, **67**, 1034 – 1040.

Krouse, J.H. and Krouse, H.J. Asthma: guidelines-based control and management. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 2008, **41**, 397 – 409.

Kyogoku, K., Hayatama, K., Yokomori, S., Shio, M. and Komatsu, M. Studies on the Constituents of *Sophora* Species. VI. Constituents of the Root of *Sophora subprostrata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1973, **21**, 1192 – 1197.

Laviolette, M., Malmstrom, K., Lu, S., Chervinsky, P., Pujet, J.C., Peszek, I., Zhang, J. and Reiss, T.F. Montelukast added to inhaled beclomethasone in treatment of asthma. Montelukast/beclomethasone additivity group. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1999, **160**, 1862 – 1868.

Lee, J.W., Lee, J.H., Lee, C., Jin, Q., Lee, D., Kim, Y., Hong, J.T., Lee M.K. and

Hwang, B.Y. Inhibitory constituents of *Sophora tonkinensis* on nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015, **25**, 960 – 962.

Li, X., Wang, D., Xia, M.Y., Wang, Z.H., Wang, W.N. and Cui, Z. Cytotoxic prenylated flavonoids from the stem bark of *Maackia amurensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2009, **57**, 302 – 306.

Li, X.N., Lu, Z.Q., Chen, G.T., Yan, H.X., Sha, Na., Guan, S.H., Yang, Min., Hua, H.M., Wu, L.J. and Guo, D.A. NMR spectral assignments of isoprenylated flavanones from *Sophora tonkinensis*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2008a, **46**, 898 – 902.

Li, X.N., Lu, Z.Q., Qin, S., Yan, H.X., Yang, M., Guan, S.H., Liu, X., Hua, H.M., Wu, L.J. and Guo, D.A. Tonkinensines A and B, two novel alkaloids from *Sophora tonkinensis*. *Tetrahedron Letters*, 2008b, **49**, 3797 – 3801.

Liang, Y.Z., Xie, P. and Chan, K. Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, 2004, **812**, 53 – 70.

Lo, W.Li., Chang, F.R., Hsieh, T.J. and Wu, Y.C. The constituents of *Euchresta formosana*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 2002, **49**, 421 – 426.

Ma, C.J., Li, G.S., Zhang, D.L., Liu, K. and Fan, X. One step isolation and purification of liquiritigenin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza uralensis* Risch.

using high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1078**, 188 – 192.

Ma, L., Wen, S., Zhan, Y., He, Y., Liu, X. and Jiang, J. Anticancer effects of the Chinese medicine matrine on murine hepatocellular carcinoma cells. *Planta Medica*, 2008, **74**, 245-251.

Ma, W.G., Fuzzati, N., Li, Q.S., Yang, C.R., Stoeckli-Evans, H. and Hostettmann, K. Polyphenols from *Eriosema tuberosum*. *Phytochemistry*, 1995, **39**, 1049 – 1061.

Marini, M., Vittori, E., Hollemborg, J. and Mattoli, S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8 in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1992, **89**, 1001 – 1009.

Miki, Y., Fujita, R. and Matsushita, K.I. Oxidative rearrangement of pentaalkoxychalcones with phenyliodine(III) bis (trifluoroacetate) (PIFA): synthesis of (±)-10-bromopterocarpin and (±)-pterocarpin. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions I*, 1998, **16**, 2533 – 2536.

Morris, H.R., Taylor, G.W., Piper, P.J., Samhoun, M.N. and Tippins, J.R. Slow reacting substances (SRSs): the structure identification of SRSs from rat basophil leukaemia (RBL-1) cells. *Prostaglandins*, 1980, **19**, 185 – 201.

Newnham, D.M., McDevitt, D.G. and Lipworth, B.J. Bronchodilator subsensitivity after chronic dosing with eformoterol in patients with asthma. *The American Journal of Medicine*, 1994, **97**, 29 – 37.

Nicholson, C.D., Challiss, R.A. and Shahid, M. Trends Pharmacol Sci. Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1991, **12**, 19 – 27.

Park, J.A., Kim, H.J., Jin, C., Lee, K.T. and Lee, Y.S. A new pterocarpan, (-)-maackiain sulfate, from the roots of *Sophora subprostrata*. *Archives of Pharmacal Research*, 2003, **26**, 1009 – 1013.

Park, Y., Moon, B.H. Lee, E., Lee, Y. Yoon, Y., Ahn, J.H., Lim, Y. ¹H and ¹³C-NMR data of hydroxyflavone derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2007, **45**, 674 – 679.

Rincon, M. and Irvin, C.G. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 2012, **8**, 1281 – 1290.

Ryu, K.H., Rhee, H.I., Kim, J.H., Yoo, H., Lee, B.Y., Um, K.A., Kim, K., Noh, J.Y., Lim, K.M. and Chung, J.H. Anti-inflammatory and analgesic activities of SKLJI, a highly purified and injectable herbal extract of *Lonicera japonica*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2010, **74**, 2022 – 2028.

Safayhi, M., Boden, S.E., Schweizer, S. and Ammon, H.P. Concentration-dependent potentiating and inhibitory effects of *Boswellia* extracts on 5-lipoxygenase product formation in stimulated PMNL. *Planta Medica*, 2000, **66**, 110 – 113.

Sakamoto, S., Kuroyanagi, M., Ueno, A. and Sekita, S. Triterpenoid saponins from *Sophora subprostrata*, *Phytochemistry*, 1992, **31**, 1339 – 1342.

Saitoh, T., Kinoshita, T. and Shibata, S. New Isoflavan and flavanone from Licorice Root. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1976, **24**, 752 – 754.

Sakai, K., Yokoyama, A., Kohno, N. and Hiwada, K. Effect of different sensitizing doses of antigen in a murine model of atopic asthma. *Clinical & Experimental Immunology*, 1999, **118**, 9 – 15.

Sasajima, M., Nakane, S., Saziki, R., Saotome, H., Hatayama, K., Kyogoku, K. and Tanaka, I. Studies on the anti-ulcer effects of isoprenyl flavonoids (1). The anti-ulcer effects of isoprenyl chalcone extracted from *Sophora subprostrata* (author's transl). *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 1978, **74**, 897 – 905.

Shepherd, M. C., Baillie, G.S., Stirling, D.I. and Houslay, M.D. Remodelling of the PDE4 cAMP phosphodiesterase isoform profile upon monocyte-macrophage differentiation of human U937 cells. *British Journal of Pharmacology*. 2004, **142**, 339 – 351.

Slade, D.J. and Kraft, M. Airway remodeling from bench to bedside: current perspectives. *Clinics in Chest Medicine*, 2006, **27**, 71 – 85.

Stadnyk, A.W. Cytokine production by epithelial cells. *The FASEB Journal*, 1994, **8**, 1041 – 1047.

Stevenson, P.C. and Veitch, N.C. Isoflavenes from the roots of *Cicer judaicum*, *Phytochemistry*, 1996, **43**, 695 – 700.

Takeshita, T., Yokoyama, K., Yi, D., Kinjo, J. and Nohara, T. Four new and twelve known sapogenols from *Sophorae Subprostratae Radix*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1991, **39**, 1908 – 1910.

Underwood, D.C., Kotzer, C.J., Bochnowicz, S., Osborn, R.R., Luttmann, M.A., Hay, D.W. and Torphy, T.J. Comparison of phosphodiesterase III, IV and dual III/IV inhibitors on bronchospasm and pulmonary eosinophil influx in guinea pigs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1994, **270**, 250 – 259.

Wang, Y., Yao, R., Gao, S., Wen, W., Du, Y., Szabo, E., Hu, M., Lubet, R.A. and You, M. Chemopreventive effect of a mixture of Chinese Herbs (antitumor B) on chemically induced oral carcinogenesis. *Molecular Carcinogenesis*, 2013, **52**, 49 – 56.

Wei, J.W., Liao, J.F., Chuang, C.Y., Chen, C.F. and Han, P.W. Cardiovascular effects

of matrine isolated from the Chinese herb Shan-dou-gen. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life Sciences*, 1985, **9**, 215 – 219.

Xiao, P., Kubo, H., Ohsawa, M., Higashiyama, K., Nagase, H., Yan, Y.N., Li, J.S., Kamei, J. and Ohmiya, S. kappa-Opioid receptor-mediated antinociceptive effects of stereoisomers and derivatives of (+)-matrine in mice. *Planta Medica*, 1999, **65**, 230 – 233.

Xie, P., Chen, S., Liang, Y.Z., Wang, X., Tian, R. and Upton, R. Chromatographic fingerprint analysis – a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *Journal of Chromatography A*, 2006, **1112**, 171 – 180.

Yamazaki, M., Arial, A., Suzuki, S. and Takeuchi, T. Protective effects of matrine and oxymatrine on stress ulcer in relation to their effects on the central nervous system. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 1984, **104**, 293 – 301.

Yang, N., Liang, B., Srivastava, K., Zeng, J., Zhan, J., Brown, L., Sampson, H., Goldfarb, J., Emala, C. and Li, X.M. The *Sophora flavescens* flavonoid compound trifolirhizin inhibits acetylcholine induced airway smooth muscle contraction. *Phytochemistry*, 2013, **95**, 259 – 267.

Yokoyama, A., Kohno, N., Fujino, S., Hamada, H., Inoue, Y., Fujioka, S., Ishida, S. and Hiwada, K. Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1995, **151**, 1354 – 1358.

Yoo, H., Ryu, K.H., Bae, S.K. and Kim, J. Simultaneous determination of trifolirhizin, (-)-maackiain, (-)-sophoranone, and 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxybenzofuran from *Sophora tonkinensis* in rat plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Separation Science*, 2014, **37**, 3235 – 3244.

Yoon, J.S., Sung, S.H., Park, J.H. and Kim, Y.C. Flavonoids from *Spatholobus suberectus*. *Archives of Pharmacal Research*, 2004, **27**, 589 – 592.

Zhai, D., Zhao, Y., Chen, X., Guo, J., He, H., Yu, Q., Yang, J., Davey, A.K. and Wang, J. Protective effect of glycyrrhizin, glycyrrhetic acid and matrine on acute cholestasis induced by alpha-naphthyl isothiocyanate in rats. *Planta Medica*, 2008, **73**, 128 – 133.

Abstract

Shan-dou-gen (*Sophora tonkinensis* Gagnepain roots and rhizomes) is 1 ~ 2 m height plant distributed all over southern China and Vietnam. The number of roots is typically two to five with cylindrical shape and yellowish-brown color. The stem has characteristic grooves on the surface with cylindrical shape, covered with short and soft hairs. Top of the stem is curved slightly like "Z" shape in Chinese character.

The dried roots shaped with long cylindrical bented have been used as a traditional herbal medicine. The surface of the dried roots is brown to black-brown color with irregular vertical wrinkles and transverse elongated protrusions. Previous studies show that this herbal substance contain several kinds of alkaloids (Matrine, oxymatrine, and methylcytisine) as well as flavonoids (sophoranone, sophoradin, and sophoranochromene) as a pharmacologically active substance. It has been long been used for the treatment of tumor, edema, pain, jaundice, diarrhea, and hemorrhoids. Moreover, recent studies show that the extracted components of Shan-dou-gen has a variety of pharmacologic effects such as strong anti-viral (Hepatitis B), anti-inflammatory, anti-pyretic, and anti-ulcer activities *in vitro* and *vivo*, while no systemic studies have been done in terms of anti-asthmatic effect of this herbal substance.

We prepared several fractions from Shan-dou-gen using several organic solvents and evaluated the anti-asthmatic efficacy of each fraction *in vitro* and *in vivo*. We found that the *n*-BuOH fraction has the most efficient anti-asthmatic efficacy. To track down the active substances in *n*-BuOH fraction, sub-fractions were prepared from the *n*-BuOH fraction using Dianion HP-20 packed column chromatography.

Chromatographic comparison among those five subfractions indicated that two sub-fractions, i.e., ST3 and ST5 can be used as the representatives of the whole *n*-BuOH fraction. Therefore, further chromatographic separation of ST3 and ST5 was done to separate the main active components and spectroscopy measurement using ¹H- and ¹³C-NMR were done to identify and elucidate the chemical structures. We identified total 23 components. We identified the chemical structures of new compound **1**, **2**, and **3**. Twenty compounds (**4** - **23**) were known in chemical structures. The chemical names are as follows: 2'-hydroxyglabrol (2,3-dihydro-7-hydroxy-2-[2,4-dihydroxy-3-(3-methyl-2-buten-1-yl)phenyl]-8-(3-methyl-2-buten-1-yl)-4*H*-1-benzopyran-4-one) (**1**), 3-methylmaackiapterocarpin B (3-methoxy-8,9-methylenedioxy-2,2-dimethylpyrano[5',6':1,2]-[6*aR*,11*aR*] pterocarpin) (**2**), 2-hydroxy-1-prenyl-pterocarpin (3-methoxy-8,9-methylenedioxy-1-(3-methylbut-2-en-1-yl)-[6*aR*,12*aR*]pterocarpin-2-ol) (**3**), sophoranone (**4**), glabrol (**5**), 2-(2',4'-dihydroxy-phenyl)-8,8-dimethyl-10-(3-methyl-2-butenyl)-8*H*-pyrano[2,3-*d*]chroman-4-one (**6**), 6,8-diprenyl-7,2',4'-trihydroxyflavanone (**7**), tonkinochromane A (**8**), maackiain (**9**), medicarpin (**10**), maackiain-3-*O*-glucoside 6"-acetate (**11**), medicarpin 3-*O*-glucoside 6"-acetate (**12**), pterocarpin (**13**), trifolirhizin (**14**), sophoranochromene (**15**), isoliquiritigenin (**16**), maackiapterocarpin B (**17**), formononetin (**18**), genistein (**19**), 7,4'-dihydroxyflavone (**20**), bolusanthin IV (**21**), 2-(2',4'-dihydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxybenzofuran (**22**), and sophoradin (**23**). For twenty-three compounds, we evaluated *in vitro* inhibition of IL-6 production. The IC₅₀ of compound **1**, **5**, **9** and **21** was 1.62, 0.73, 3.01, and 4.02 μM. Notably, we found that compound **9** (maackiain) can be used as an active marker for the quality control because it also showed strong anti-infiltration effect on leukocyte and eosinophil in *in vivo* murine asthma model. Although we

measured anti-asthmatic efficacy *in vitro* and *in vivo* using single compound, we decided to use *n*-BuOH (named SKI3301), considering low yields and complex separation steps for single active compounds and so on. We also assumed that the multiple-targeting by SKI3301 might be more useful for treating a variety of mediator-related disease, asthma.

We investigated *in vitro* and *in vivo* anti-asthmatic efficacy of SKI3301. *In vitro* airway contraction study showed that SKI3301 has stronger inhibitory effect than montelukast on the contraction of airways induced by OVA. Notably, strong anti-contraction efficacy was comparable to that of SRS-A mediated contraction, mechanism of montelukast. We also observed significant anti-inflammatory effect *in vivo* murine asthma model. To understand this prominent efficacy, we further carried out mechanism studies on several mediators which are known to be critical in asthma. The IC_{50} for 5-lipoxygenase (5-LO), phosphodiesterase 3 (PDE-3), phosphodiesterase 4 (PDE-4), and thromboxane synthase (TxS) were 1.61, 11.8, 5.56, and 0.634 $\mu\text{g/mL}$, respectively, indicating that all four mediators could be effectively down-regulated by SKI3301. Finally, the reproducibility and robustness of preparation process for SKI3301 was investigated by performing similarity evaluation for 9 batches according to MFDS guideline. Analysis results of chromatogram of 9 batches demonstrated the batch-to-batch consistency indicating good quality control of preparation process.

In summary, we can conclude that SKI3301 obtained from Shan-dou-gen be a promising drug candidate for the treatment of asthma proven efficacy *in vitro* and *in vivo*. Mechanism studies show that multiple mediators such as 5-LO, PDE-3, PDE-4, and TxS, are effectively inhibited in each experimental model, implying that the

multiple symptoms might be controlled simultaneoly in clinical situation, hoping more effective therapy than current therapy using single-mode of action.

Student Number: 2008-30997